Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água

Neusely da Silva
Valéria C.A. Junqueira
Neliane F.A. Silveira
Marta H. Taniwaki
Rosana F. S. dos Santos
Renato A. R. Gomes

4ª edição

Livraria VARELA

Neusely da Silva
Valéria Christina Amstalden Junqueira
Neliane Ferraz de Arruda Silveira
Marta Hiromi Taniwaki
Rosana Franscisco Siqueira dos Santos
Renato Abeilar Romeiro Gomes

Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água



São Paulo
4ª edição
2010

Projeto gráfico: DR PUBLICIDADE - (55) 30284824 - e-mail: drossato@via-rs.net
Capa: DR PUBLICIDADE - CNPJ 03.310.817/0001-54 - Inscr. Municipal: 4280202 - Santa Maria - RS
Revisão: autor
Figuras: autor
Impressão: HR Gráfica e Editora
Tiragem: 1.000 exemplares

Dados internacionais de catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água/Neusely da Silva...
(et al. J. 4. Ed. — São Paulo : Livraria Varela, 2010).

Outros autores: Valéria Christina Amstalden Junqueira, Neliane Ferraz de Arruda Silveira, Marta Hiromi Taniwaki, Rosana Francisco Siqueira dos Santos, Renato Abeilar Romeiro Gomes.

632 páginas - formato 21 x 28 cm (fechado)

ISBN 978-85-7759-013-1

1. Água –Análise 2. Água,Microbiologia 3. Alimentos - Análise 4 - Alimentos – Microbiologia

I.Silva, Neusely da. II. Junqueira, Valéria Christina Amstalden. III. Silveira, Neliane Ferraz de Arruda.
IV. Taniwaki, Marta Hiromi. V. Santos, Rosana Francisco Siqueira dos.VI.Gomes,
Renato Abeilar Romeiro.

10-03193 CDD- 628.161

Índices para catálogo sistemático:

1. Água: Análise microbiológica : Métodos: Manuais 628.161
2. Alimentos: Análise microbiológica : Métodos: Manuais 628.161

Sumário

Capítulo 3. Técnicas básicas de contagem de microrganismos em placas

Capítulo 4. Técnicas básicas de contagem de microrganismos pelo Número Mais Provável

Capítulo 5. Técnicas básicas de detecção da presença/ausência de microrganismos

Capítulo 6. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos em placas

Capítulo 7. Contagem de bolores e leveduras

Capítulo 8. Contagem de enterobactérias

Capítulo 9. Contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

Capítulo 13. Contagem de enterococos

Capítulo 14. Contagem de bactérias láticas

Capítulo 15. *Campylobacter*

Capítulo 16. *Cronobacter*

Capítulo 17. *Escherichia coli* O157:H7

Capítulo 18. *Listeria monocytogenes*

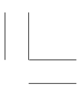
Capítulo 19. *Salmonella*

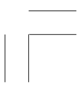
Capítulo 20. Vibrios patogênicos

Capitulo 24. *Pseudomonas* spp

Capítulo 25. Preparação de material de laboratório para utilização em análises microbiológicas

Capítulo 26. Cuidados na preparação de meios de cultura e reagentes para análises microbiológicas



Apresentação

Esse manual foi preparado com métodos padronizados e aceitos em âmbito nacional e internacional, publicados no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 4ª Edição, 2001), *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater* (APHA, 21ª edição, 2005), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (APHA, 17ª edição, 2004), *Official Methods of Analysis of AOAC International* (AOAC, 18ª edição, 2005), *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, atualizado por capítulos, online), *Microbiology Laboratory Guidebook* (FSIS/USDA, atualizado por capítulos, online), *Fungi and Food Spoilage* (Pitt & Hocking, 2009) e últimas edições das normas ISO.

O texto oferece um material de conteúdo profundo, moderno e atualizado, mas apresentado de forma didática, com figuras e esquemas que facilitam a compreensão. Nessa quarta edição o conteúdo foi ampliado para atender também à análise de água. Vários métodos foram revistos e atualizados, novos métodos foram introduzidos e um novo capítulo para *Pseudomonas* spp foi criado. Abaixo seguem as alterações dessa edição, em comparação com a edição anterior.

Capítulo 1 - Coleta, transporte e estocagem de amostras para análise

Item 1.4.2 (revisado). A temperatura recomendada pela ISO 7218:2007 para a estocagem de alimentos congelados passa para menor do que 15ºC negativos.

Item 1.4.3 (revisado). A temperatura recomendada pela ISO 7218:2007 para transporte e estocagem de alimentos refrigerados passa para entre um e 8ºC no transporte e 3±2ºC na estocagem, com intervalo máximo de 36h entre a coleta e a análise.

Item 1.4.4 (revisado). A temperatura máxima aceita pela ISO 7218:2007 no transporte de produtos comercialmente estéreis, à temperatura ambiente, é de 40ºC.

Capítulo 2 - Preparação de amostras para análise

Item 2.3.4.1 (revisado). O procedimento de lavagem de carcaças de aves foi adotado pela ISO 17604 (amendment 1:2009).

Item 2.3.5 (revisado). Algumas considerações sobre a guarda de conta amostras, segundo a nova edição da ISO 7218:2007.

Capítulo 3 - Técnicas básicas de contagem de microrganismos em placas

Item 3.2.2.b. (revisado). A nota b3 traz a exigência da nova edição da ISO 7218:2007 quanto ao número mínimo de diluições requerido na contagem em placas.

Item 3.3.2.b. (revisado). A nota b5 traz a exigência da nova edição da ISO 7218:2007 quanto ao número mínimo de diluições requerido na contagem em placas.

Item 3.7 (novo). Contagem de colônias e cálculo dos resultados da contagem em placas segundo nova edição da ISO 7218:2007.

Capítulo 4 - Técnicas básicas de contagem de microrganismos pelo NMP

Anexo 4.1 (revisado). Foram incluídas duas novas tabelas de NMP para cálculo dos resultados do teste de diluição única: uma para a distribuição de cinco alíquotas de 20g ou ml e uma para a distribuição de cinco alíquotas de 10g ou ml.

Capítulo 7 - Bolores e leveduras

Item 7.1 (ampliado). A introdução foi complementada com informações sobre leveduras resistentes aos conservantes (preservative resistant yeasts - PRY) e leveduras osmofílicas.

Item 7.5 (novo). Métodos de contagem de leveduras resistentes aos conservantes (PRY), da 3ª Edição do *Fungi and Food Spoilage* (Pitt & Hocking, 2009) e 4ªEdição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001).

Item 7.6 (novo). Método de contagem de leveduras osmofílicas, da 4ªEdição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2001).

Capítulo 9 - Contagem de coliformes totais - termotolerantes e *E. coli*

Item 9.6 (novo). Método ISO 7251:2005 para contagem de coliformes termotolerantes presuntiva para *E. coli* em alimentos, rações e ambiente industrial.

Item 9.7 (novo). Método do substrato cromogênico (Colilert®) AOAC 991.15 de detecção ou contagem de coliformes totais e *E. coli* em água.

Capítulo 12 - Clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens*

Item 12.1 (ampliado). A introdução foi complementada com informações sobre *C. perfringens* em água.

Item 12.5 (novo). Método ISO 6461-1:1986) para determinação do número mais provável de esporos de clostrídios sulfito redutores em água.

Item 12.6 (novo). Método da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) para determinação do número mais provável de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* em água, descrito na Norma Técnica L5.213 (CETESB, 1993).

Capítulo 13 - Contagem de enterococos

Item 13.4 (novo). Método do S*tandard Methods for the Examination of Water & Wastewater* (APHA, 21a edição, 2005) para a contagem de enterococos em água.

Capítulo 16 -*Cronobacter*

Item 16.1 (revisado). A introdução foi totalmente revisada, apresentando a nova taxonomia de [*Enterobacter sakazakii*], cujas cepas foram divididas em várias novas espécies e alocadas no novo gênero *Cronobacter*.

Capítulo 18 - *Listeria monocytogenes*

Item 18.1 (ampliado). A introdução foi complementada com informações sobre os métodos da ISO (International Standardization Organization) para detecção e para contagem *L. monocytogenes*.

Item 18.3 (revisado). A versão de setembro de 2005 do método MLG/FSIS/USDA foi substituída pela versão de agosto de 2009, com as seguintes alterações:

a) Incluído o Caldo MOPS-BLEB como meio alternativo de enriquecimento secundário, que pode ser usado em lugar do Caldo Fraser (item 18.3.2.b).

b) Incluídas orientação para determinação do NMP de *L. monocytogenes* nas amostras (item 18.3.2.a)

c) Incluídos sistemas comerciais alternativos para testes bioquímicos e moleculares (item 18.3.2.d).

Item 18.5 (novo). Método ISO 11290:1998 Amendment 1:2004, para contagem de *L. monocytogenes* em placas.

Item 18.6 (novo). Método ISO 11290:1996 Amendment 1:2004, para detecção (presença/ausência) de *L. monocytogenes.*

Capítulo 19 - *Salmonella*

Item 19.1 (revisado). A Tabela 19.5 foi atualizada, com os novos "kits" analíticos adotados pela AOAC como métodos oficiais.

Item 19.3 (Revisado). A versão de junho de 2006 do método BAM/FDA foi substituída pela versão de dezembro de 2007, com as seguintes alterações:

a) Introduzido o procedimento de análise de polpa de mamei, com variação na preparação da amostra (nota a.12 e última linha da Tabela 19.7) e enriquecimento seletivo (nota b.1).

b) Introduzida uma pequena alteração no procedimento de preparo de tomates inteiros (nota a.9) e mangas inteiras (nota a.10).

Item 19.4 (Revisado). A versão de outubro de 2004 do método MLG/FSIS/USDA foi substituída pela de fevereiro de 2008, com as seguintes alterações:

a) A composição de amostras para analise já não é descrita (retirada do item 19.1, subtítulo composição de amostras para análise).

b) Incluídas orientação para determinação do NMP de *Salmonella* nas amostras (item 19.4.2.a)

Capítulo 22 - Contagem de esporos de bactérias

Item 22.8 (novo). Método IFU 12/2007, da International Federation of Fruit Juice Producers, para detecção e contagem de *Alicyclobacillus.*

Capítulo 24 (novo) - *Pseudomonas*

Introduzido um capítulo dedicado à *Pseudomonas* spp em alimentos e *Pseudomonas aeruginosa* em água.

Capítulo 25 - Preparação de material de laboratório para análises microbiológicas

Item 25.4 (revisado). Inserida a recomendação da ISO 7218:2007 para esterilização de vidraria em autoclaves e estufas de esterilização.

Capítulo 26 - Cuidados na preparação de meios de cultura e reagentes para análises microbiológicas

Capítulo 26 (renumerado). Foi renumerado, passando de capítulo 24 para capítulo 26.

Item 26.1.1.1 (revisado). A condutividade máxima recomendada pela ISO 11133:2009 para água purificada de preparo de meios e reagentes passa de 3,33μS/cm para 25μS/cm.

Item 26.1.1.2 (revisado). Foi inserida a denominação padrão adotada pela ISO 11133-1:2009 para peptonas.

Item 26.2.10 (revisado). Revisadas as condições de estocagem de meios de cultura, recomendadas pela ISO 11133-1:2009.

Anexo 1. Preparo de meios e reagentes para análises

Foi ampliado com os novos meios e reagentes utilizados nos novos métodos ou nos métodos revisados.

Anexo 2. Legislação

Introduzidas a Resolução RDC 275/05 da ANVISA (Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral e Água Natural) e a Portaria 518/04 do Ministério da Saúde (Controle e Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e Padrão de Potabilidade).

DOS AUTORES

Neusely da Silva é Engenheira de Alimentos, com Doutorado em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). É pesquisadora do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL), órgão de pesquisa da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. Exerce atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação (P&D&I) para o setor de alimentos, com vários livros e artigos científicos publicado no Brasil e no exterior. Sua área de concentração é o desenvolvimento, adequação, avaliação e validação de novos métodos de análise microbiológica de água e alimentos. Endereço eletrônico: neusely@ital.sp.gov.br.

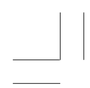
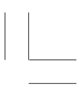
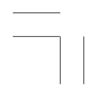
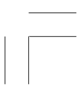
Valéria Christina Amstalden Junqueira é bióloga, com Doutorado em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Vice diretora do Laboratório de Microbiologia do ITAL, concentra suas atividades no estudo da deterioração de alimentos termoprocessados e no estudo de bactérias anaeróbias patogênicas de importância em água e alimentos, incluindo *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*. Possui uma ampla experiência de consultoria a industrias privadas processadoras de alimentos principalmente em produtos contaminados por microrganismos anaeróbios patogênicos e deteriorantes. Endereço eletrônico: vcaj@ital.sp.gov.br.

Neliane Ferraz de Arruda Silveira é bióloga com Doutorado em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na área de higiene e legislação de alimentos. Pesquisadora do Laboratório de Microbiologia do ITAL, concentra suas atividades no controle da qualidade microbiológica de alimentos, com ênfase em pescado marinhos de água salgada e doce; frutas e hortaliças minimamente processadas, alimentos servidos em refeições coletivas e produtos cárneos. Endereço eletrônico: neliane@ital.sp.gov.br.

Marta Hiromi Taniwaki é bióloga, com Doutorado na Universidade de New South Wales, em Sydney-Australia. É diretora do a Unidade Laboratorial de Referência em Microbiologia do ITAL, onde exerce atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação (P&D&I). Expert em micologia de alimentos, membro da International Commission on Food Mycology (ICFM), presta consultoria a empresas públicas e privadas, para o controle de fungos e micotoxinas em alimentos. Endereço eletrônico: marta@ital.sp.gov.br.

Rosana Francisco Siqueira dos Santos é bióloga, com mestrado em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foi gerente do Laboratório de Microbiologia do ITAL, exerceu atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação (P&D&I). Concentra suas atividades no estudo de *Cronobacter* e métodos para sua detecção. Endereço eletrônico: rosanasiq@gmail.com.

Renato Abeilar Romeiro Gomes é Engenheiro Agrícola, com mestrado em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa. Foi diretor do Centro de Informação em Tecnologia de Alimentos (CIAL) do ITAL, concentrando suas atividades na divulgação de informações tecnológicas para o setor de alimentos. Endereço eletrônico: rarg@ital.sp.gov.br.

Capítulo1

Coleta, Transporte e Estocagem de Amostras para Análises

1.1 INTRODUÇÃO

A maioria das recomendações contidas nesse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001). Quando diferentes ou complementares às do *Compendium*, foram também incluídas recomendações da 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005), específicas para a análise de água, da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004), específicas para a análise de produtos lácteos e de normas da International Organization for Standardization (ISO 6887-4:2003/Cor.1:2004, ISO 7218:2007), recomendadas para ensaios realizados com metodologia ISO.

Alguns termos utilizados ao longo do texto são oriundos da terminologia relacionada com a amostragem de lotes e devem ter seu significado corretamente compreendido:

Lote

Lote é definido como uma quantidade de alimento de mesma composição e características físicas, químicas e sensoriais, produzida e manuseada numa mesma batelada, sob as mesmas condições. Na prática, lote geralmente é a quantidade de alimento produzida dentro de um intervalo de tempo de funcionamento de uma linha de produção, sem interrupção.

Amostra de lote e unidade de amostra

Amostra de lote é uma fração do total produzido, retirada ao acaso, para avaliar as condições do lote. No caso de alimentos acondicionados em embalagens individuais, é composta de **n** embalagens individuais. No caso de grandes massas de alimentos, não acondicionados em embalagens individuais, é composta de **n** alíquotas do produto. As embalagens ou alíquotas individuais são chamadas de unidades de amostra e, para a avaliação do lote, são analisadas separadamente. A partir do conjunto de resultados da análise das **n** unidades de amostra, é possível inferir as características de todo o lote, mas o resultado da análise de uma única unidade de amostra não pode ser tomado como representativo do lote.

Nas análises de *Salmonella*, cujo padrão em alimentos é ausência em qualquer das unidades de amostra, é comum a prática de compor (misturar) as unidades de amostra, para realizar um único ensaio. A presença na amostra composta é inaceitável, independente de quantas ou quais unidades de amostra estejam contaminadas. Maiores detalhes são apresentados no capítulo específico de *Salmonella*.

Planos de amostragem de lotes

Sempre que se tratar da avaliação de lotes ou partidas, a tomada das **n** unidades de amostra deverá seguir um plano de amostragem estatístico adequado. Os mais utilizados são os planos de duas ou três classes estabelecidos pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002), adotados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

O plano de duas classes classifica os lotes em duas categorias, aceitável ou inaceitável, dependendo dos resultados da análise das **n** unidades de amostra. São os mais aplicados no caso de ensaios de presença/ausência, como *Salmonella*, por exemplo, em que ausência é aceitável e a presença em qualquer das **n** unidades de amostra é inaceitável.

O plano de três classes classifica os lotes em três categorias, aceitável, qualidade intermediária mas aceitável e inaceitável. São recomendados para ensaios qualitativos, para os quais o padrão não é ausência, mas sim, valores dentro de uma faixa entre **m** e **M**. Os parâmetros utilizados nesses planos, para a tomada de decisões a respeito dos lotes são:

n: é o número de unidades de amostras a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote, para serem analisadas individualmente. As **n** unidades de amostra constituem a amostra representativa do lote. Para ensaios de presença/ausência, não quantitativos (*Salmonella* ou *Listeria monocytogenes*, por exemplo) as unidades de amostra poderão ser compostas e realizada uma única análise, porém, na composição das amostras devem ser consultadas e obedecidas as orientações dos capítulos relacionados aos ensaios específicos em questão.

m: é o padrão microbiológico estabelecido para um dado microrganismo, num dado alimento. Em um plano de três classes esse valor separa um lote aceitável de um lote com qualidade intermediária aceitável.

M: é um limite tolerável, acima do padrão, que pode ser atingido por algumas (**c**) unidades de amostra, mas não pode ser ultrapassado por nenhuma. Em um plano de duas classes, **M** separa o lote aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável.

c: dentre as **n** unidades de amostra que constituem a amostra representativa do lote, **c** é o número máximo de unidades que podem ser aceitas com contagens acima do padrão **m**, desde que não acima do limite **M**. Nos casos em que o padrão microbiológico é ausência, **c** é igual a zero e aplica-se o plano de duas classes.

Unidade analítica

A unidade de amostra geralmente contém uma quantidade de produto maior do que a necessária para a análise, porque, ao se coletar uma unidade de amostra, há sempre o cuidado de se tomar quantidades suficientes para estocagem de contra-amostras e prevenção de perdas por acidente. Unidade analítica é a quantidade de alimento efetivamente utilizada na realização de um ou mais ensaios da unidade de amostra. O número de unidades analíticas necessárias para a análise depende do número e tipos de ensaios que serão realizados na mesma unidade de amostra, sendo uma para os ensaios gerais de quantificação (contagem total de aeróbios mesófilos, contagem de bolores e leveduras, contagem de coliformes totais/fecais/*E. coli*, contagem de *S. aureus*, contagem de *B. cereus*, contagem de *C. perfringens*), uma para cada ensaio de presença/ausência (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e todos os outros que requeiram enriquecimento em caldo específico) e uma para cada outro ensaio que requeira tratamento diferenciado da amostra (contagem de esporos de bactérias, contagem de bolores termorresistentes e outros).

1.2 MATERIAL NECESSÁRIO

Frascos e utensílios para coleta

- Frascos ou bolsas plásticas estéreis de capacidade variada
- Espátulas
- Facas
- Colheres
- Tesouras
- Pinças
- Caladores
- Amostradores verticais de tubo duplo
- Amostradores tipo “corer”
- Furadeira elétrica e brocas esterilizadas
- Caixas de isopor com gelo seco ou sachês de gelo reutilizável em gel

Reagentes e diluentes

- Etanol 70%
- Solução de hipoclorito de sódio a 100mg/l
- Solução 3% ou 10% de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$)
- Solução 15% de EDTA
- Solução Tamponada Glicerol Sal

Equipamentos

- Freezer com temperatura abaixo de 20°C negativos com termômetro calibrado
- Refrigerador com temperatura entre 0 e 4°C com termômetro calibrado

1.3 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Sempre que possível, amostras de alimentos acondicionados em embalagens individuais devem ser coletadas e encaminhadas ao laboratório na sua embalagem comercial original, fechada e intacta. Cada embalagem unitária do produto constitui uma unidade de amostra e devem ser coletadas tantas unidades de amostra quantas forem requeridas pelo plano de amostragem. Se a embalagem unitária contiver uma quantidade de alimento insuficiente para as análises e guarda de contra amostras, deve-se coletar várias embalagens unitárias, como parte de uma mesma unidade de amostra. No momento da análise, deve-se juntar o conteúdo dessas diversas embalagens em um único frasco estéril, misturando-se bem e retirar a unidade analítica da mistura. Se o produto não permitir mistura, deve-se tomar, de cada uma das embalagens unitárias, porções de peso aproximadamente igual, para compor a unidade analítica daquela unidade de amostra.

No caso de alimentos contidos em tanques ou grandes embalagens, impossíveis de serem transportadas ao laboratório, deve-se transferir porções representativas da massa total para frascos ou bolsas de coleta estéreis, sob condições assépticas.

1.3.1 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DE FRASCOS PARA COLETA DE ALIMENTOS ACONDICIONADOS EM EMBALAGENS NÃO INDIVIDUAIS

a) Utilizar frascos ou bolsas com tampas à prova de vazamentos, de material não tóxico, aprovado para contato com alimentos e, de preferência, autoclaváveis ou pré-esterilizados. Não é recomendável o uso de frascos de vidro, devido ao risco de quebra, contaminação do ambiente de coleta com cacos de vidro e perda do conteúdo.

b) Escolher frascos com tamanho adequado para a quantidade de alimento que será coletada. Para definir a quantidade de amostra a ser coletada, considerar que cada unidade de amostra deve conter, no mínimo, duas vezes o número de unidades analíticas que serão utilizadas nos ensaios, de preferência, três a quatro vezes esse valor, para a separação da contra-amostra e prevenção de possíveis perdas. Levar em conta, ainda, o fato de que os frascos de coleta não devem ser completamente preenchidos pelo alimento, sendo recomendável utilizar, no máximo, três quartos de sua capacidade, para facilitar a posterior homogeneização da amostra, antes da retirada da(s) unidade(s) analítica(s).

c) Os frascos e utensílios não pré-esterilizados que serão utilizados na coleta (espátulas, colheres, tesouras, pinças, caladores, etc.) devem, de preferência, ser esterilizados individualmente em autoclave (121°C/30 minutos) ou em estufa de esterilização (170±10°C/2h). Alguns outros métodos que podem ser utilizados como alternativa são a flambagem em chama, a imersão em etanol e combustão do álcool (não elimina esporos) e o tratamento com soluções desinfetantes. Nesse último caso devem ser usados desinfetantes aprovados para superfícies de contato com alimentos, aplicados conforme a orientação dos fabricantes e seguidos de 12 enxágües com água destilada estéril, para a remoção dos resíduos. Frascos ou bolsas não estéreis que apresentem, num teste de lavagem da superfície interna, contagem de microrganismos viáveis menor do que 1 UFC/ml de capacidade, podem ser utilizados sem esterilização prévia.

1.3.2 PROCEDIMENTOS PARA A COLETA DE ALIMENTOS ACONDICIONADOS EM EMBALAGENS NÃO INDIVIDUAIS

a) Antes de iniciar a coleta da unidade de amostra, promover uma mistura de toda a massa de alimento, para garantir que a distribuição dos microrganismos seja homogênea. Retirar então, com utensílios ou instrumentos adequados, a quantidade de produto necessária para compor a unidade de amostra.

b) Se não for possível promover a mistura da massa de alimentos antes do início da amostragem, retirar porções de diferentes partes do conteúdo, até obter a quantidade de produto adequada para compor a unidade de amostra. Evitar a retirada de porções das regiões próximas à superfície ou abertura do tanque ou volume.

   b1) Para coletar amostras de pó, em diferentes partes de tanques ou grandes embalagens, podem ser utilizados caladores ou amostradores verticais de tubo duplo, com comprimento suficiente para atingir o centro da massa de alimento. Usar um amostrador estéril diferente para cada unidade de amostra coletada, ou desinfetar o instrumento entre uma amostragem e outra.

   b2) Para compor uma unidade de amostra com porções de diferentes pontos de alimentos em grandes peças sólidas, deve-se usar facas, pinças e fórceps estéreis para cortar pedaços menores do alimento.

   b3) No caso de grandes blocos de alimentos congelados, como blocos de pescados e frutos do mar, blocos de ovo líquido, etc., o mais adequado é utilizar uma furadeira elétrica

(com a broca previamente esterilizada) combinada com um funil estéril. A broca é inserida no funil (cujo diâmetro de abertura inferior deve ser apenas ligeiramente maior que o diâmetro da broca) e encostada no ponto do bloco que se deseja amostrar. Liga-se a furadeira e as raspas congeladas do alimento vão-se dirigindo para a superfície, sendo coletadas no funil, de onde podem ser transferidas para um frasco de coleta adequado.

b4) Quando a coleta for feita através de torneiras ou tubulações, limpar a parte externa da saída com etanol 70%, flambar, se o material for resistente ao fogo, e deixar escoar uma certa quantidade do produto, antes de iniciar a coleta. Isso vai promover uma lavagem da tubulação e remover os resíduos acumulados.

b5) Para a amostragem de margarina e produtos similares ("spreads") a ISO 6887-4 (2003/Cor.1:2004) recomenda remover a camada externa (3 a 5mm) e retirar as unidades de amostra com um amostrador tipo "corer", previamente esterilizado. Introduzir o instrumento na diagonal, sem atingir o fundo, rodar num círculo completo e retirar, trazendo uma porção cônica do produto.

c) Lembrar que a superfície externa dos frascos e bolsas de coleta não é estéril. Assim, não segurar os frascos ou bolsas diretamente acima da massa de alimento, pois podem cair ou introduzir contaminantes no produto. Da mesma forma, nunca introduzir um frasco de coleta diretamente no produto, mas sim, utilizar um utensílio adequado para retirar as unidades de amostra.

d) Ao retirar o instrumento de coleta cheio com o produto coletado, não manuseá-lo sobre os outros instrumentos pré-esterilizados, pois respingos do alimento podem contaminar os que serão utilizados posteriormente.

e) Abrir os frascos ou bolsas de coleta apenas o necessário para introduzir o produto e fechar imediatamente.

f) Não tocar a superfície interna dos frascos ou bolsas de coleta e suas tampas.

g) Alimentos contaminados podem conter microrganismos perigosos para a saúde. Essas amostras devem ser coletadas por pessoal bem treinado na manipulação de microrganismos, ciente dos cuidados necessários para sua própria proteção. Na dúvida, tratar cada amostra como se estivesse contaminada.

1.3.3 COLETA DE ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM CASOS DE DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR (DTAS)

Coletar e analisar amostras de todos os alimentos suspeitos, o mais cedo possível. Entretanto, não adianta coletar amostras de alimentos que tenham sofrido abuso de temperatura ou que já se encontrem em estado de parcial deterioração. Os resultados dessas análises serão de pouca ou nenhuma utilidade para as conclusões da investigação. Se não houver sobras das refeições suspeitas, pode-se tentar uma das seguintes alternativas: coletar amostras de refeições similares, preparadas posteriormente sob as mesmas condições, coletar amostras dos ingredientes e matéria-prima utilizados na preparação das refeições suspeitas e coletar os vasilhames onde as refeições suspeitas se encontravam acondicionadas.

1.3.4 COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA

O Capítulo 60 da 4ª Edição do *Compendium* (Kim & Feng, 2001) trata da coleta de água engarrafada, considerada pelo Codex Alimentarius como alimento. Essas amostras devem ser coletadas na embalagem original, lacrada. Em havendo interesse ou necessidade de coletar volumes

menores, a partir de embalagens de maior capacidade, deve-se homogeneizar todo o conteúdo, invertendo a embalagem várias vezes, desinfetar o bocal com etanol 70% e, em condições assépticas, abrir o lacre com uma faca ou tesoura estéril ou flambada. Desprezar o volume inicial e coletar a amostra em um frasco estéril adequado.

Para a coleta de outros tipos de água, a parte 9000 da 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) traz as seguintes orientações:

Para coletar amostras de torneiras e tubulações, limpar a área externa da saída com uma solução de hipoclorito de sódio a 100mg/l ou com etanol 70%, flambando, se o material for resistente ao fogo. Abrir totalmente a torneira e deixar a água fluir por 2 a 3 minutos, para limpar a tubulação. Reduzir o fluxo para coletar a amostra sem respingos para fora do frasco de coleta.

Para coletar amostras de água de poço ou cisterna com bomba, bombear a água por cinco a 10min, para estabilizar a temperatura da água antes da coleta. Se não houver uma bomba, preparar os frascos de coleta com um peso na base e introduzir o frasco diretamente no poço. É necessário cuidado para não contaminar a amostra com material acumulado na superfície da água.

Para coletar amostras de água de rios, lagos ou reservatórios, segurar o frasco de coleta pela base e mergulhar abaixo da superfície da água, com a boca para baixo. Direcionar a boca do frasco para a corrente de água e elevar ligeiramente, para que a água fique retida. Se não houver corrente de água, empurrar o frasco para frente horizontalmente, no sentido contrário ao da mão.

Amostras de água clorada devem ter o cloro residual neutralizado imediatamente após a coleta, para impedir a continuação do seu efeito bactericida sobre a microbiota presente. Para tanto, adicionar aos frascos de coleta, antes da esterilização, 0,1ml de uma solução 3% de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), para cada 100ml de amostra que se pretende coletar. Essa quantidade é suficiente para neutralizar 5mg de cloro residual por litro de amostra. Nas situações em que a concentração de cloro residual seja superior a 5mg/l, utilizar 0,1ml de uma solução 10% de tiossulfato de sódio, para cada 100ml de amostra que se pretende coletar. Essa quantidade é suficiente para neutralizar 15mg de cloro residual por litro de amostra. Podem também ser utilizadas bolsas plásticas ou frascos estéreis, disponíveis comercialmente já contendo o tiossulfato de sódio. Se a amostra for coletada e enviada ao laboratório pelo próprio interessado, sem a prévia neutralização do cloro, adicionar a solução de tiossulfato de sódio estéril imediatamente após a chegada da amostra, sob condições assépticas.

Amostras de água com teor alto de metais (maior que 1,0mg/l), incluindo cobre e zinco, devem ser coletadas em frascos com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), agente quelante para reduzir a toxidade dos metais sobre os microrganismos. Isso é particularmente importante se o intervalo entre a coleta e a análise for maior do que quatro horas. Para tanto, adicionar aos frascos de coleta, antes da esterilização, 0,3ml de uma solução 15% de EDTA, para cada 100ml de água a ser coletada (372mg/l). Ajustar o pH da solução em 6,5 antes do uso. As soluções de EDTA e tiossulfato podem ser adicionadas ao mesmo frasco.

1.4 TRANSPORTE E ESTOCAGEM DE AMOSTRAS ATÉ O MOMENTO DA ANÁLISE

Como regra geral, deve-se transportar e estocar amostras de alimentos da mesma forma como o produto é normalmente transportado e estocado na sua comercialização. As orientações abaixo devem ser observadas para garantir a integridade do produto até o momento das análises:

1.4.1 TRANSPORTE E ESTOCAGEM DE ALIMENTOS COM BAIXA ATIVIDADE DE ÁGUA

Alimentos desidratados, secos ou concentrados são estáveis microbiologicamente, podendo ser transportados e estocados à temperatura ambiente. Devem, entretanto, ser protegidos contra a umidade.

1.4.2 TRANSPORTE E ESTOCAGEM DE ALIMENTOS CONGELADOS

Amostras de alimentos comercializados na forma congelada devem ser transportadas e mantidas congeladas até o momento da análise, não podendo sofrer descongelamento total ou parcial durante o transporte. O *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda que a temperatura de estocagem dessas amostras não seja superior a 20ºC negativos. A ISO 7218 (1996) recomenda temperatura abaixo de 18ºC negativos, de preferência 24±2ºC negativos. A ISO 7218 (2007) recomenda temperatura de 15ºC negativos, de preferência 18ºC negativos.

O transporte deve ser feito em caixas de isopor com gelo seco, porém, certos cuidados devem ser observados. O produto não deve entrar em contato com o gelo seco porque a absorção do CO_2 pode alterar o pH. Se a tampa da embalagem não vedar a entrada de gases e/ou se embalagem for permeável aos gases e/ou se tornar quebradiça com o frio, deve-se usar uma embalagem secundária. Geralmente um embrulho em papel grosso é suficiente para prevenir esse problema.

Rótulos e etiquetas usados na identificação das amostras devem ser à prova d'água, para prevenir a perda dos dados.

1.4.3 TRANSPORTE E ESTOCAGEM DE ALIMENTOS REFRIGERADOS

Amostras de alimentos comercializados na forma refrigerada devem ser transportados e mantidos sob refrigeração desde a coleta até o momento da análise. O *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda, como regra geral, transporte e estocagem entre 0 e 4,4ºC e intervalo máximo de 36 horas entre a coleta e a análise. A ISO 7218 (2007) recomenda transporte entre um e 8ºC, estocagem a 3+2ºC e intervalo máximo de 36h entre a coleta e a análise (24h no caso de amostras altamente perecíveis). Na impossibilidade de se proceder à análise no intervalo de tempo preconizado, as amostras devem ser congeladas e mantidas nas mesmas condições descritas para amostras congeladas (-15ºC, preferencialmente -18ºC), desde que o congelamento não interfira na recuperação do(s) microrganismo(s) alvo (vide item exceções abaixo).

O *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda que o transporte seja feito em caixas de isopor com gelo, sendo recomendável o uso de sachês de gelo reutilizável em gel, para evitar o acúmulo de líquido nas caixas. Na indisponibilidade de gelo em gel, pode ser utilizado gelo comum, desde que acondicionado em bolsas plásticas. Caixas bem fechadas, com espaço amplo para gelo, suficiente para envolver todos os frascos de amostra, podem manter temperaturas de refrigeração adequadas por até 48 horas, na maioria das situações. Como regra geral, essas amostras não devem ser congeladas, por isso, não é recomendável o uso de gelo seco nas caixas de isopor. Se o tempo de trânsito for prolongado e houver necessidade de usar gelo seco, as embalagens de amostras não devem entrar em contato direto com as embalagens de gelo seco, para evitar o congelamento. Rótulos e etiquetas usados na identificação das amostras devem ser a prova d'água, para prevenir a perda dos dados.

Exceções. Para certos produtos ou microrganismos as recomendações são diferenciadas:

a) No capítulo específico para bactérias lácticas o congelamento não é recomendado, devido à grande susceptibilidade desses microrganismos às injúrias pelo congelamento.

b) No capítulo específico para vibrios patogênicos recomenda-se que as amostras sejam estocadas sob resfriamento moderado (7-10ºC) e analisadas o mais rapidamente possível, porque a temperatura ótima de manutenção é de 15-18ºC e a maioria das cepas não sobrevive bem a 4ºC. O congelamento das amostras é desaconselhado e, em caso de absoluta necessidade, deve ser feito a 80ºC negativos.
c) No caso de *C. perfringens* devem ser analisadas, se possível, imediatamente, pois a estocagem por poucos dias sob refrigeração ou congelamento pode levar a uma redução de três a cinco ciclos logarítmicos na contagem em placas. Na impossibilidade de se proceder à análise imediata, o *Compendium* (Labbe, 2001) recomenda que sejam refrigeradas pelo menor tempo possível, não devendo ser congeladas ou mantidas sob refrigeração prolongada. Havendo necessidade de estocagem por mais de 48 horas, tratar as amostras com Solução Tamponada Glicerol Sal (na quantidade requerida para atingir a concentração final de 10% na amostra) e estocar entre 55 e 60ºC negativos. O *Bacteriological Analytical Manual* (Rhodehamel & Harmon, 2001) recomenda que sejam analisadas imediatamente ou refrigeradas por não mais de oito horas, à temperatura próxima de 10ºC. Para transporte e estocagem por período superior a oito horas, preparar assepticamente a amostra para o congelamento, da seguinte forma: transferir porções de 25g para bolsas plásticas, adicionar 25ml da Solução Tamponada Glicerol Sal, excluir o ar das bolsas e misturar. Para amostras líquidas, misturar porções de 25ml com igual volume da Solução Tamponada Glicerol Sal, em concentração dupla. Congelar imediatamente, em "freezer" a 20-30ºC negativos. Para o transporte, transferir as amostras tratadas para frascos não permeáveis ao CO_2 (Nalgene ou equivalente) e transportar em caixa de isopor com gelo seco. Manter as amostras congeladas até o momento da análise, de preferência por poucos dias.
d) No capítulo específico para *Campylobacter* a ISO 10272-1 (2006) destaca a sensibilidade de *Campylobacter* ao congelamento e à secagem, recomendando que as amostras não sejam congeladas e que sejam protegidas contra a perda de umidade. Indica estocagem à 3±2ºC e análise o mais rápido possível. O *Microbiological Laboratory Guidebook* (Ransom & Rose, 1998) destaca que *Campylobacter* é sensível ao congelamento e morre à temperatura ambiente. Durante a estocagem refrigerada (indica 4ºC) pode ser sobrepujado pela microbiota psicrotrófica acompanhante nas amostras, que devem ser analisadas o mais rápido possível. Se o congelamento for inevitável, devem ser usados agentes criopotetores (glicerol ou dimetil sulfóxido na concentração de 10% em relação à quantidade de amostra). Para a estocagem congelada de "swabs", indica Caldo Brucella suplementado com 10% de polivinil pirrolidina. O *Bacteriological Analytical Manual* (Hunt *et al.*, 2001) destaca que *Campylobacter* é sensível ao ar, secagem, baixo pH, aquecimento, congelamento e estocagem prolongada, podendo sofrer injúrias que dificultam a detecção. Células velhas ou estressadas gradualmente adquirem forma cocoide e se tornam mais difíceis de cultivar. Para estocagem prolongada, *C. jejuni* subsp *jejuni* pode sobreviver duas a quatro semanas sob refrigeração (4ºC), se for garantida baixa tensão de oxigênio e proteção contra perda de umidade (exceto no caso de leite cru). Nas mesmas condições, também pode sobreviver dois a cinco meses a 20ºC negativos. Outras espécies, nas mesmas condições, podem sobreviver (mas não se multiplicar) uma a três semanas a 4ºC (exceto no caso de leite cru). A população diminui dois ciclos logarítmicos a 20ºC negativos, mas os sobreviventes podem ser recuperados após mais de cinco meses. Uma vez abertos os frascos ou embalagens, a análise deve ser feita o mais rápido possível, porque a introdução de oxigênio é particularmente deletéria para as células, já debilitadas pela estocagem prolongada.

e) No capítulo específico para contagem de aeróbios psicrotróficos, recomenda-se que as amostras sejam analisadas no intervalo de seis horas, a partir da coleta. A estocagem refrigerada permite a multiplicação dos psicrotróficos e o tempo de geração de vários desses microrganismos encontra-se dentro desse intervalo. O congelamento não é indicado para essas amostras, porque pode provocar injúria ou morte de vários microrganismos. Se o congelamento for indispensável considerar na avaliação dos resultados que parte da microbiota pode ter sido perdida.
f) Amostras de moluscos e crustáceos (ostras, mexilhões, mariscos, camarões, etc. devem ser analisadas dentro de no máximo seis horas após a coleta, não devendo ser congeladas (Midura & Bryant, 2001).
g) Amostras de ovo líquido refrigerado devem ser analisadas, se possível, dentro de quatro horas após a coleta, não devendo ser congeladas (Ricke *et al.*, 2001).
h) Amostras de produtos vegetais fermentados ou acidificados não comercialmente estéreis devem ser estocadas sob refrigeração por não mais do que 24 horas, não devendo ser congeladas (Fleming *et al.*, 2001).

1.4.4 TRANSPORTE E ESTOCAGEM DE ALIMENTOS COMERCIALMENTE ESTÉREIS EM EMBALAGENS HERMÉTICAS

Alimentos comercialmente estéreis com embalagens em condições normais, podem ser transportados e estocados à temperatura ambiente, devendo ser protegidos contra exposição a temperaturas superiores a 40°C (ISO 7218:2007). Amostras de refrigerantes engarrafados, comercializados à temperatura ambiente, também podem ser transportados e estocados nessas condições.

Embalagens estufadas devem ser acondicionadas em bolsas plásticas devido ao perigo de vazamento de material de alto risco microbiológico. O transporte e a estocagem podem ser feitos sob refrigeração, para prevenir explosão, mas se houver suspeita de deterioração por bactérias termófilas, a refrigeração é contra-indicada. Células vegetativas de termófilos usualmente morrem sob efeito do frio e não é comum a esporulação nos produtos enlatados (Denny & Parkinson, 2001).

1.4.5 TRANSPORTE E ESTOCAGEM DE AMOSTRAS DE ÁGUA

O Capítulo 60 da 4ª Edição do *Compendium* (Kim & Feng, 2001) recomenda:
a) Para água engarrafada na embalagem original, lacrada, transporte e estocagem à temperatura ambiente, sem necessidade de refrigeração.
b) Para embalagens abertas ou amostras transferidas para outros frascos, transporte e estocagem sob refrigeração (não especifica a temperatura) e intervalo entre coleta e análise preferencialmente de 8h, não devendo ultrapassar 24h.

Para outros tipos de água, a parte 9000 da 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) traz a seguinte orientação:
a) Como regra geral, transporte e estocagem sob refrigeração (menor que 10°C) e intervalo entre coleta e análise não superior a 24h.
b) Para avaliação da conformidade de água potável, transporte e estocagem sob refrigeração (menor que 10°C) e intervalo entre coleta e análise não superior a 30h, para quantificação de coliformes, ou 8h, para a quantificação de heterotróficos (contagem total de aeróbios mesófilos em placas).
c) Para a avaliação da conformidade de água não potável, transporte e estocagem sob refrigeração (menor que 10°C) e intervalo entre coleta e análise não superior a 8h.

1.5 RECEPÇÃO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Na recepção de amostras para análise no laboratório, devem ser observadas as condições da embalagem e as condições em que foi feito o transporte, antes da aceitação do pedido de análise. Deve ser recusada qualquer amostra com embalagem rasgada, furada, violada, com corpos estranhos ou qualquer outro tipo de defeito, bem como amostras transportadas sob condições inadequadas. Se o interessado estiver encaminhando amostra com embalagem já aberta ou com selo violado (comum no caso de amostras encaminhadas para responder a reclamações de consumidores, por exemplo), pode-se proceder à análise, dependendo do tipo de embalagem, tipo de produto e microrganismos investigados, porém, as condições em que a amostra foi recebida devem constar da identificação da amostra e do laudo final de análise.

1.6 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001* - Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, 10 jan.2001. Seção 1, p. 45-87.

DENNY, C.B. & PARKINSON, N.G. Canned foods – Tests for cause of spoilage. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 62, p.583-600.

DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

FLEMING, H.P., McFEETERS, R.F. & BREIDT, F. Fermented and acidified vegatables. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 51, p.521-532.

HUNT, J.M., ABEYTA, C. & TRAN, T. *Campylobacter*. In: U S Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online*, disponível no site <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>,acesso em 23/03/06. Chapter 7, revised March 2001.

HUNT, M.E. & RICE, E.W. Microbiological examination. In: EATON *et al.* (Eds), *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000, p.9.1-9.169.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. *Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN0-306-47262-7).

ISO 6887-4. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 4: *Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, and fish and fishery products, 1st ed.* The International Organization for Standardization, 2003. Corrigendum 1:2004.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs –*General requirements and guidance for microbiological examination, 3rd ed.* The International Organization for Standardization, 2007.

ISO 10272-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter – Part 1: Detection Method, 1th ed.* The International Organization for Standardization, 2006.

KIM, H. & FENG, P. Bottled water. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 60, p.573-576.

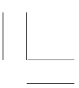
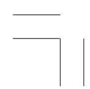
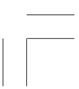
LABBE, R.G. *Clostridium perfringens.* In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 34, p.325-330.

MIDURA, T.F. & BRYANT, R.G. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 2, p.13-23.

RANSOM, G.M. & ROSE, B.E. Isolation, identification, and enumeration of *Campylobacter jejuni/coli* from meat and poultry products. In: USDA/FSIS *Microbiology Laboratory Guidebook 3rd Ed.*, 1998. Chapter 6, <http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp>, acesso em 30/03/06.

RICKE, S.C., BIRKHOLD, S.G. & GAST, R.K. Egg and egg products. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 46, p.473-481.

RHODEHAMEL, E.J. & HARMON, S.M. *Clostridium perfringens.* In: US Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) Online, <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>, Chapter 16, revisão de janeiro de 2001. Acesso em 20/04/2006.

Capítulo 2

Preparação de Amostras para Análise

2.1. INTRODUÇÃO

A maioria das orientações contidas nesse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001). Quando diferentes ou complementares às do *Compendium*, foram também incluídas recomendações da 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Eaton *et al.*, 2005), específicas para a análise de água, da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004), específicas para a análise de produtos lácteos e de várias normas da International Organization for Standardization (ISO 6887-1:1999, ISO 6887-2:2003, ISO 6887-3:2003, ISO 6887-4:2003/Cor.1:2004, ISO 7218:2007, ISO 8261:2001, ISO 17604:2003/Amd.1:2009), recomendadas para ensaios realizados com metodologia ISO.

A preparação das amostras para a análise envolve três etapas, que são a homogeneização do conteúdo e retirada da unidade analítica, a preparação da primeira diluição da unidade analítica e a preparação de diluições decimais seriadas, para inoculação nos meios de cultura.

Antes de iniciar os procedimentos, recomenda-se que sejam observados alguns cuidados, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas:

Assegurar-se de que a área de trabalho está limpa e as portas e janelas fechadas, para evitar correntes de ar.

Desinfetar todas as superfícies de trabalho com um desinfetante adequado (etanol 70%, cloreto de benzalcônio a 500ppm, hipoclorito de sódio ou outro composto de cloro a 200ppm são adequados).

Assegurar-se de que todo o material necessário esteja disponível nas bancadas.

Lavar as mãos e desinfetar com um desinfetante adequado ao contato com a pele. Se requerido, colocar luvas, verificando a necessidade ou não de luvas nos capítulos específicos de ensaios com patógenos.

Trabalhar preferencialmente no interior de capelas de fluxo laminar vertical, para prevenir a contaminação da amostra pelo ambiente e do ambiente e do analista pela amostra. Na indisponibilidade de uma capela de fluxo laminar, trabalhar na região próxima à chama de um bico de Bunsen que, em bom funcionamento, deve ter a chama azulada. Na manipulação de amostras em pó não é recomendável trabalhar na chama de bico de Bunsen. A ISO 7218:2007 estabelece o uso de uma área separada ou de uma capela de fluxo laminar.

Evitar a formação de aerossóis ao abrir tubos e/ou frascos depois de agitar, liberar o conteúdo de pipetas ou flambar alças de inoculação.

Nunca pipetar com a boca, mas sim, usando pipetadores.

Depois de usados, acomodar as pipetas e outros utensílios em bandejas de descarte, não diretamente sobre as bancadas.

Todos os instrumentos e utensílios utilizados na abertura das embalagens e retirada das unidades analíticas (tesouras, pinças, facas, espátulas, etc.) devem ser previamente esterilizados (em autoclave ou estufa de esterilização) ou mergulhados em etanol 70% e flambados no momento do uso.

Antes de abrir as embalagens, desinfetar a área externa com etanol 70%, mantendo o contato até a evaporação do álcool. No caso de embalagens flexíveis, cortar com uma tesoura estéril. No caso de embalagens rígidas com tampa rosqueável, desrosquear e remover a tampa assepticamente. No caso de latas com sistema de abertura tipo "easy open", abrir assepticamente e remover a tampa. No caso de latas sem sistema "easy open", usar um abridor de latas estéril. No caso de latas, vidros, caixinhas e outras embalagens destinados ao teste de esterilidade comercial, devem ser seguidos procedimentos diferenciados, descritos no Capítulo específico. Esses procedimentos objetivam garantir a integridade da selagem, para análises posteriores da embalagem, se necessárias. Observar e anotar qualquer anormalidade nas embalagens ou no conteúdo interno, como estufamento, vazamento, odor e/ou aparência estranha, presença de corpos estranhos, etc.

2.2. MATERIAL NECESSÁRIO

Reagentes e diluentes

- Etanol 70%
- Solução de iodo
- Cloreto de benzalcônio a 500ppm, hipoclorito de sódio ou outro composto de cloro a 200ppm
- Água Peptonada 0,1% (H_2Op)
- Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Água Salina Peptonada (H_2Osp)
- Água Peptonada Tamponada (BPW)
- Solução de Ringer ¼ de concentração
- Tampão Fosfato Cloreto de Magnésio
- Solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 7,5±0,2
- Solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 8,4±0,2
- Solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com anti espumante e pH ajustado em 7,5±0,2
- Solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com anti espumante e pH ajustado em 8,4±0,2
- Solução de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) 2%
- Leite em pó desnatado dissolvido em Tampão Fosfato (0,1g/100ml)
- Solução de tripolifosfato ($Na_3O_{10}P_3$) 2%
- Tergitol-7 Aniônico ou Tween 80
- Sulfito de potássio (K_2SO_3)
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N estéril
- Solução de ácido clorídrico (HCl) 1N estéril
- Solução alcoólica de púrpura de bromocresol a 0,04%

Equipamentos

- Capela de fluxo laminar vertical

- Bico de Bunsen
- "Shaker"
- Refrigerador com temperatura abaixo de 4°C com termômetro calibrado
- Banho maria com temperatura regulável na faixa de 30 a 45ºC, com termômetro calibrado
- Furadeira elétrica e brocas esterilizadas
- Balança calibrada
- Agitador magnético com barras magnéticas esterilizadas
- Liquidificador
- Homogeneizador peristáltico ("stomacher")
- Agitadores tipo "vortex"

Instrumentos e utensílios

- Tesouras
- Pinças
- Facas
- Martelos
- Espátulas
- Bagetas de vidro
- Pipetas de capacidade variada
- Funis estéreis de capacidade variada
- "Swabs" e esponjas para amostragem de superfícies
- Moldes para amostragem de superfícies
- Bandejas de descarte

2.3. HOMOGENEIZAÇÃO DA AMOSTRA E RETIRADA DA UNIDADE ANALÍTICA

Unidade analítica é a quantidade de material retirado da amostra para ser utilizado na realização de um ou mais ensaios. O número de unidades analíticas que devem ser retiradas e a quantidade de material em cada unidade analítica depende do número e tipos de ensaios que serão realizados na mesma amostra. De maneira geral são necessárias:

a) **Unidades analíticas para os ensaios de presença/ausência com enriquecimento em caldo específico**. É requerida uma unidade analítica para cada ensaio (*Salmonella, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Campylobacter* sp, *Escherichia coli* O157:H7, *Cronobacter, Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus*). A quantidade de material em cada uma dessas unidades analíticas é definida nos capítulos específicos para esses ensaios.

b) **Unidades analíticas para os ensaios com tratamento diferenciado da amostra**. É requerida uma unidade analítica para cada ensaio (esterilidade comercial, contagem de esporos de bactérias, contagem de bolores termorresistentes e outros). A quantidade de material em cada uma dessas unidades analíticas também é definida nos capítulos específicos para esses ensaios.

c) **Unidade analítica para os ensaios gerais de quantificação**. Os ensaios gerais de quantificação compreendem a contagem total de aeróbios mesófilos ou psicrotróficos, a contagem de bolores e leveduras, a contagem de bactérias lácticas, a contagem de enterococos, a contagem de enterobactérias, a contagem de coliformes totais/fecais/*E. coli*, a contagem de *S. aureus*, a

contagem de *B. cereus* e a contagem de *C. perfringens*. Esses ensaios são feitos com a mesma unidade analítica que, no Brasil, geralmente é de 25 gramas ou mililitros da amostra. A ISO 6887-1 (1999) recomenda que seja de, no mínimo, 10g para sólidos ou 10ml para líquidos. O Capítulo 2 do *Compendium* (Midura & Bryant, 2001), recomenda que seja de 50g para alimentos sólidos e 10, 11 ou 50ml para produtos líquidos. Entretanto, nos capítulos específicos, a quantidade recomendada na maioria dos casos é de 25g ou menor. Assim, unidades analíticas de 25g atendem às exigências da ISO 6887-1 (1999) e, também, às do *Compendium,* para a maioria dos ensaios. Há casos diferenciados em que a unidade analítica deve ser maior ou menor do que o especificado aqui, devendo ser consultado o Anexo 2.2, para verificar essas exceções.

Antes da retirada da(s) unidade(s) analítica(s), o conteúdo da amostra deve ser bem homogeneizado, para garantir que a porção removida seja representativa de todo o material. Os procedimentos para se conseguir uma boa homogeneização são diferentes para produtos líquidos, produtos sólidos e produtos com contaminação predominantemente superficial, conforme apresentado abaixo.

2.3.1. PROCEDIMENTO PARA A HOMOGENEIZAÇÃO E RETIRADA DA UNIDADE ANALÍTICA DE PRODUTOS LÍQUIDOS

No caso de amostras líquidas (viscosidade não maior que a do leite) acondicionadas em frascos com espaço suficiente para a agitação, inverter a embalagem 25 vezes. Se o frasco apresentar mais de 2/3 do espaço preenchido, inverter 25 vezes num arco de 30cm, em sete segundos. Se não houver espaço livre para agitação, utilizar um segundo frasco, estéril e transferir a amostra de um frasco para o outro, por três vezes. Se houver formação de espuma, aguardar que a espuma disperse. Se a amostra for gaseificada (refrigerantes produtos similares), transferir o conteúdo para um frasco estéril de boca larga e, com a tampa ligeiramente aberta, agitar em "shaker" até a completa expulsão dos gases (essa etapa pode ser dispensada se a unidade analítica for transferida diretamente para o frasco de filtração, nos ensaios pelo método da filtração em membrana).

Retirar a unidade analítica com uma pipeta, inserida numa profundidade não maior do que 2,5cm abaixo da superfície do líquido. A medida deve ser volumétrica e o intervalo entre a homogeneização da amostra e a retirada da unidade analítica não deve ultrapassar 3min. O *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) não estabelece limite para a incerteza da medição do volume que, segundo a ISO 6887-1 (1999), não deve ser maior que 5%.

2.3.2. PROCEDIMENTO PARA A HOMOGENEIZAÇÃO E RETIRADA DA UNIDADE ANALÍTICA DE PRODUTOS SÓLIDOS OU LÍQUIDOS CONCENTRADOS

No caso de amostras sólidas ou líquidos concentrados, seguir as orientações do Anexo 2.1, que define os procedimentos mais adequados de homogeneização e retirada da unidade analítica de diferentes tipos de alimentos. O *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda que a incerteza da medição da massa não seja maior do que 0,1g. A ISO 6887-1 (1999) recomenda que não exceda 5%. O intervalo entre a homogeneização e a retirada da unidade analítica não deve ultrapassar 15 minutos.

Se a amostra estiver congelada, o *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda descongelar sob refrigeração ($\leq$4,4^{o}C) por não mais de 18 horas, na embalagem original. Alternativamente, podem ser usadas temperaturas mais altas, mas não superiores a 40°C e por não mais do que 15 minutos. Nesse caso, é requerida a agitação freqüente da amostra, para facilitar o descon-

gelamento. O uso de um banho com temperatura controlada e agitação é recomendável. A ISO 6887-4 (2003/Cor.1:2004) recomenda descongelar sob refrigeração (0 a 4°C) por não mais de 24 horas, na embalagem original. Alternativamente, podem ser usadas temperaturas mais altas (18 a 27°C) por não mais do que três horas. No caso de grandes blocos de alimentos congelados, que não podem ser descongelados nas condições preconizadas acima, pode ser seguido o procedimento recomendado pela ISO 6887-2 (2003) para grandes peças de carne. Utilizar uma furadeira elétrica (com a broca previamente esterilizada) combinada com um funil estéril. Inserir a broca no funil (cujo diâmetro de abertura inferior deve ser apenas ligeiramente maior que o diâmetro da broca) e posicionar a broca no ponto do bloco que se deseja amostrar. Ligando-se a furadeira, as raspas congeladas vão-se acumulando no funil, de onde pode(m) ser retirada(s) a(s) unidade(s) analítica(s) necessária(s) para os ensaios.

Se a amostra for heterogênea, composta por diferentes camadas de composições distintas (bolos recheados, tortas, sobremesas e outros pratos prontos para consumo, por exemplo), compor a unidade analítica com porções das diferentes camadas, levando em conta a proporção presente no produto. Alternativamente, homogeneizar todo o conteúdo da amostra e retirar a unidade analítica do macerado. Se essa homogeneização for feita em liquidificador, a ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda que o tempo de homogeneização não ultrapasse um minuto, para evitar aquecimento excessivo. Uma terceira opção é tomar unidades analíticas distintas de cada camada e analisar separadamente.

Se a quantidade de amostra encaminhada para a análise for menor do que a(s) unidade(s) analítica(s) requerida(s), o *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda submeter metade à análise, reservando a outra metade como contra-amostra. Se a homogeneização da amostra for feita em liquidificador, a quantidade de amostra mais diluente (primeira diluição 10^{-1}) no copo do liquidificador deve ser suficiente para cobrir as facas do aparelho. Para produtos cárneos, a ISO 6887-3 (2003) recomenda usar todo o material nos ensaios.

2.3.3. PROCEDIMENTO PARA A RETIRADA DA UNIDADE ANALÍTICA PELA TÉCNICA DO ESFREGAÇO DE SUPERFÍCIE

A técnica do esfregaço de superfície aplica-se aos alimentos cuja contaminação é predominantemente superficial, como carcaças de bovinos, suínos, aves e peixes. Aplica-se também à análise de superfícies de equipamentos, mesas, utensílios e embalagens.

O esfregaço pode ser feito com "swabs" estéreis ou, se a área amostrada for grande, com esponjas estéreis. Esse material pode ser adquirido em embalagens individuais, estéreis. As esponjas podem ser substituídas por tampões de algodão estéreis, preparados no laboratório. Os "swabs" também podem ser preparados no laboratório, com hastes de madeira de aproximadamente 15cm de comprimento por 3mm de diâmetro e a parte absorvente em algodão com aproximadamente 2cm de comprimento por 5mm de diâmetro.

2.3.3.1. Amostragem com "swabs"

Preparar tubos ou frascos com 10ml de um diluente adequado, sendo recomendados pelo *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) a Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB) e pela ISO 6887-1 (1999) a Água Salina Peptonada (H_2Osp) ou a Água Peptonada Tamponada (BPW). Retirar o "swab" de sua embalagem estéril, segurando a haste na extremidade oposta à do algodão. Umedecer o algodão no diluente, comprimindo-o contra as paredes do frasco para remover o excesso de líquido.

Usando um molde estéril de 50cm^2, delimitar a área a ser amostrada, segurando o molde firmemente contra a superfície. Aplicar o "swab" com pressão, descrevendo movimentos da esquerda para a direita e depois de baixo para cima. Rodar o "swab" continuamento, para que toda a superfície do algodão entre em contato com a amostra. Após a aplicação, transferir o "swab" para o tubo ou frasco de diluente, quebrando a parte manuseada da haste na borda interna do tubo ou frasco, antes de mergulhar o restante do "swab" no diluente. Repetir esse procedimento mais uma vez, sobre a mesma área, usando um "swab" seco. Recolher o segundo "swab" no mesmo frasco ou tubo de diluente.

O líquido de coleta dos "swabs" pode ser utilizado tanto nos ensaios gerais de quantificação como nos ensaios de presença/ausência, que requerem enriquecimento em caldo diferenciado (no segundo caso, seguir as orientações dos capítulos específicos). Considerar que esse procedimento amostra uma área de 50cm^2 e cada mililitro de diluente, depois de recolhidos os "swabs", corresponde a 5cm^2 de superfície. Tanto a área amostrada quanto o volume de diluente podem variar, de acordo com a necessidade ou com as características da amostra.

Para fazer o esfregaço de meias carcaças de bovinos e suínos usando o mesmo procedimento, a ISO 17604 (2003) recomenda amostrar os pontos apresentados nas Figuras 2.1 e 2.2. Usar um "swab" para cada ponto e, entre um ponto e outro, mergulhar o molde em etanol 70% e flambar. Os "swabs" podem ser recolhidos em um mesmo frasco, com um volume total de diluente correspondente a 10ml para cada par de "swabs".

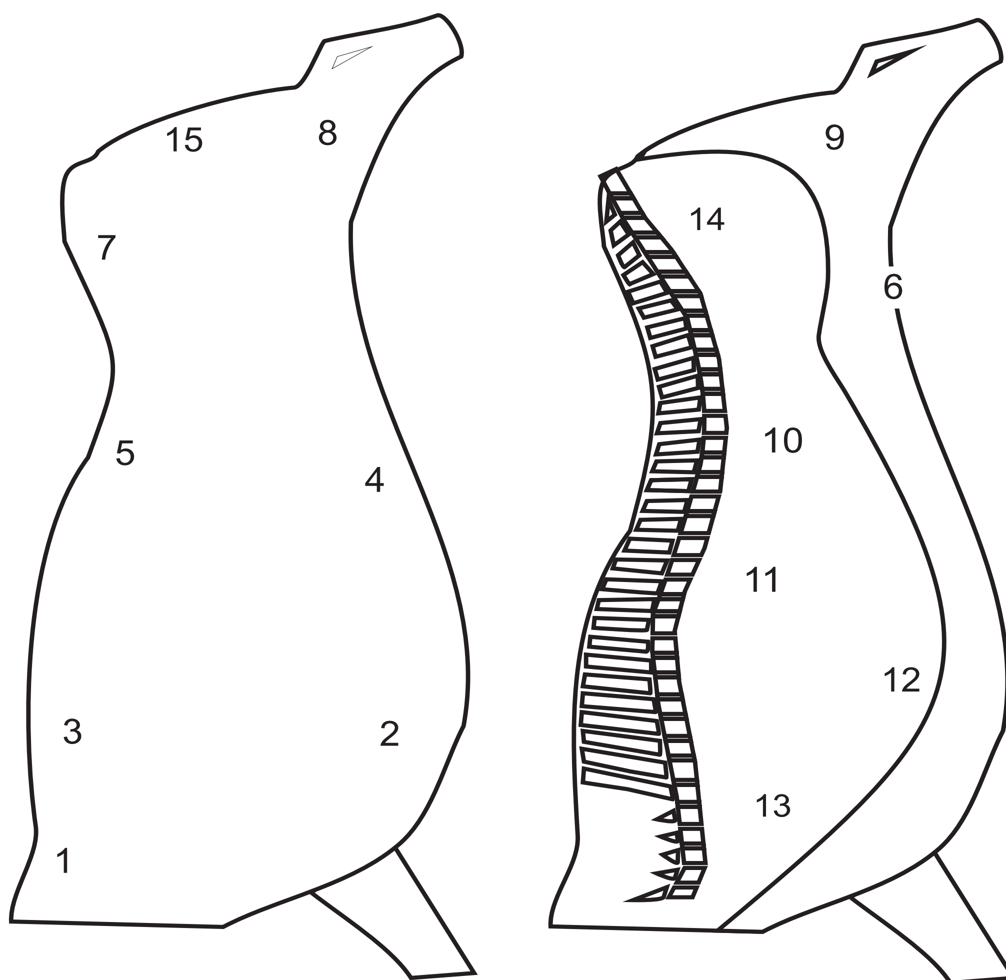


Figura 2.1. Pontos recomendados para a amostragem de carcaças de bovinos com "swabs".

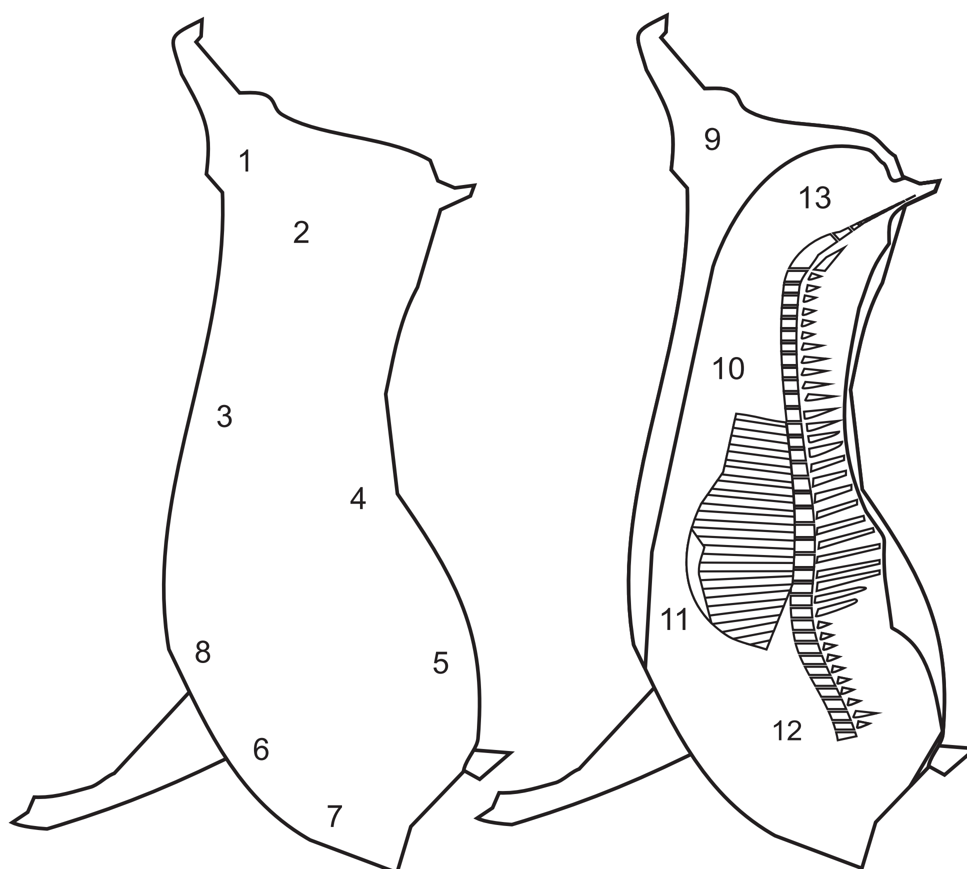


Figura 2.2. Pontos recomendados para a amostragem de carcaças de suínos com "swabs".

2.3.3.2. Amostragem com esponjas

Preparar tubos ou frascos com 25ml de um dos diluente recomendados para os "swabs". Abrir a bolsa plástica contendo a esponja (ou tampão de algodão) estéril e adicionar uma quantidade de diluente suficiente para molhar a esponja, sem excesso de fluído visível. Segurando a bolsa pelo lado de fora, massagear a esponja para umedecer uniformemente. Lavar bem as mãos, colocar um par de luvas estéreis e retirar a esponja da bolsa.

Usando um molde vazado estéril, de 10x10cm, delimitar a área a ser amostrada, segurando o molde firmemente contra a superfície. Aplicar a esponja com pressão, descrevendo 10 movimentos da esquerda para a direita e 10 movimentos de baixo para cima. Após a aplicação, colocar a esponja de volta na bolsa e adicionar o restante do diluente, completando os 25ml.

O líquido de coleta das esponjas pode ser utilizado tanto nos ensaios gerais de quantificação como nos ensaios de presença/ausência que requerem enriquecimento em caldo diferenciado (no segundo caso, seguir as orientações dos capítulos específicos). Considerar que esse procedimento amostra uma área de 100cm^2 e cada mililitro de diluente, depois de recolhida a esponja, corresponde a 4cm^2 de superfície. Tanto a área amostrada quanto o volume de diluente podem variar, de acordo com a necessidade ou com as características da amostra.

Para fazer o esfregaço de meias carcaças de bovinos e suínos, usar o mesmo procedimento para cada um dos pontos recomendados pela ISO 17604 (2003), apresentados nas Figuras 2.1 e 2.2. Usar uma esponja para cada ponto e, entre um ponto e outro, mergulhar o molde em etanol 70% e flambar. As esponjas podem ser recolhidas em uma mesma bolsa, adicionando à essa bolsa todas as porções restantes do volume de 25ml correspondente a cada esponja.

2.3.4. PROCEDIMENTO PARA A RETIRADA DA UNIDADE ANALÍTICA PELA TÉCNICA DA LAVAGEM SUPERFICIAL

A técnica da lavagem superficial aplica-se a alimentos de contaminação predominantemente superficial, como carcaças de aves inteiras, cortes de aves, peixes, cascas de ovos, grãos, sementes, castanhas, amendoins, que podem ser mergulhados em um diluente adequado, contido em uma bolsa estéril. Aplica-se também à análise de embalagens que possam ser fechadas e agitadas com um diluente em seu interior, para lavagem e coleta da contaminação.

2.3.4.1. Procedimento para a lavagem de carcaças de aves

Procedimento recomendado pela ISO 17604 (amendment 1:2009) e pelo USDA/FSIS (2004), que pode ser utilizado para a análise simultânea de *Salmonella* e outros microrganismos.

Drenar o excesso de líquido das embalagens, transferir a carcaça para uma bolsa estéril e pesar. Adicionar à bolsa e na cavidade da carcaça, 400ml de um dos diluentes recomendados para "swabs" (o USDA/FSIS, 2004 recomenda Tampão Fosfato pH 7,2). Segurando a carcaça com uma mão e fechando a abertura da bolsa com a outra, agitar rodando o líquido na bolsa (cerca de 35rpm), de forma a lavar toda a superfície interna e externa da carcaça.

O líquido obtido na lavagem pode ser utilizado tanto nos ensaios gerais de quantificação como nos ensaios de presença/ausência que requerem enriquecimento em caldo diferenciado (no segundo caso, seguir as orientações dos capítulos específicos). Considerar que, nesse procedimento, cada mililitro do lavado corresponde ao peso da carcaça dividido por 400. Por exemplo, se o peso da carcaça for de 1600g, cada mililitro do lavado corresponde a 4g da amostra. Para os ensaios de presença/ausência em 25g podem ser adicionados 6,25ml do lavado a 56,25ml de cada caldo de enriquecimento que inicia o respectivo ensaio (diluição 1:10, vide item 2.4).

2.3.4.2. Procedimento para a lavagem de outros alimentos

Transferir a amostra para uma bolsa estéril e pesar. Usando os mesmos diluentes recomendados para "swabs", adicionar à bolsa o volume de diluente requerido para diluição inicial 1:1 (1ml de diluente por grama de amostra). Fechando a abertura da bolsa com uma mão, agitar a amostra e massagear as peças com a outra mão, por fora das bolsas, com os devidos cuidados para que pontas ou outras protuberâncias não venham a furar a embalagem. No caso de grãos, sementes, castanhas e produtos similares, a amostra pode ser colocada em um frasco com o diluente e agitada por 10min em "shaker".

O líquido obtido na lavagem pode ser utilizado tanto nos ensaios gerais de quantificação como nos ensaios de presença/ausência que requerem enriquecimento em caldo diferenciado (no segundo caso, seguir as orientações dos capítulos específicos). Considerar que, nesse procedimento, cada mililitro do lavado corresponde a 1g de amostra.Para os ensaios de presença/ausência em 25g podem ser adicionados 6,25ml do lavado a 56,25ml de cada caldo de enriquecimento que inicia o respectivo ensaio (diluição 1:10, vide item 2.4).

2.3.4.3. Procedimento para a lavagem de embalagens

Esse procedimento é recomendado para embalagens com tampa à prova de vazamento. No caso de embalagens sem a tampa ou com tampas que não sejam à prova de vazamento, recorrer ao método do "swab".

Usando os mesmos diluentes recomendados para "swabs", adicionar à embalagem uma quantidade de diluente suficiente para lavar toda a superfície interna, por agitação (1/5 da capacidade

da embalagem, por exemplo). Fechar e, com as mãos, agitar vigorosamente a embalagem, para remover os microrganismos aderidos às paredes internas. Procurar atingir todos os pontos da superfície interna, de forma a garantir uma completa remoção dos contaminantes presentes.

O líquido obtido na lavagem pode ser utilizado tanto nos ensaios gerais de quantificação como nos ensaios de presença/ausência que requerem enriquecimento em caldo diferenciado (no segundo caso, seguir as orientações dos capítulos específicos). Considerar que, nesse procedimento, cada mililitro do lavado corresponde à capacidade da embalagem dividido pelo volume de diluente. Por exemplo, se a capacidade da embalagem for de 500ml e o volume de diluente igual a 100ml, cada mililitro do lavado corresponde a $5cm^3$.

2.3.5. GUARDA DE CONTRA-AMOSTRAS

A ISO 7218 (2007) recomenda que, depois da retirada da(s) unidade(s) analítica(s), o material remanescente seja estocado nas mesmas condições utilizadas antes da análise. As amostras perecíveis precisam ser congeladas, porém é destacado o fato de que o descongelamento da contra-amostra para repetição do(s) ensaio(s) não é uma prática aceitável, devido à possível morte de parte da população presente. No caso de produtos congelados, esse problema pode ser solucionado descongelando-se para a análise apenas a porção requerida no(s) ensaio(s). A quantidade remanescente, que não sofreu descongelamento, pode ser mantida congelada como conta-amostra, para uma posterior repetição do(s) ensaio(s), se necessária. No caso de produtos refrigerados, não há forma aceitável de manter contra-amostras sem congelamento. No caso de repetição do(s) ensaio(s), a interpretação do(s) resultado(s) deve levar em consideração o fato de que a população do(s) microrganismo(s) alvo pode ter diminuído em razão do congelamento.

No caso de amostras cuja coleta da unidade analítica tenha sido feita pela técnica do esfregaço de superfície ou da lavagem superficial, congelar como contra-amostra a parte não utilizada do diluente em que foram recolhidos os contaminantes. Também nesse caso, levar em consideração o fato de que a população do(s) microrganismo(s) alvo pode diminuir em razão do congelamento.

O tempo mínimo de guarda das contra-amostras é o requerido para a obtenção dos resultados dos ensaios, devendo, entretanto, ser definido a critério do laboratório. O descarte final das amostras pode ser feito no lixo, porém, aquelas deterioradas ou suspeitas de conter microrganismos nocivos à saúde devem ser descontaminadas em autoclave (121°C/30min) antes do descarte (ISO 7218:2007).

2.4. PREPARO DA 1° DILUIÇÃO DA UNIDADE ANALÍTICA

No prosseguimento da análise, a unidade analítica deve ser diluída e homogeneizada com um diluente adequado, para permitir a inoculação nos meios de cultura. Os diluentes e a diluição inicial recomendados variam em função do tipo de amostra e do tipo de ensaio que será realizado, conforme descrito abaixo:

Diluentes para os ensaios de presença/ausência

Esses ensaios, definidos no item 2.3, são feitos com diluição e homogeneização diretamente no caldo de enriquecimento, especificados nos capítulos específicos.

Diluentes para os ensaios que requeiram tratamento diferenciado da amostra

Para esses ensaios, definidos no item 2.3, também devem ser consultados os capítulos específicos.

Diluentes para os ensaios gerais de quantificação

Para esses ensaios, definidos no item 2.3, são feitas as seguintes recomendações:

O *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda a Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB).

O *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Davis & Hickey, 2004) recomenda, para a análise de produtos lácteos, a Solução de Ringer ¼ de concentração, a Água Peptonada 0,1% (H_2Op), a Água Salina Peptonada (H_2Osp), o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB) (chamado de Água de Diluição Fosfato) ou o Tampão Fosfato Cloreto de Magnésio (chamado de Água de Diluição Fosfato Magnésio).

O *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) recomenda, para a análise de água, a Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato Cloreto de Magnésio, chamado de Água de Diluição.

A ISO 6887-1 (1999) recomenda a Água Salina Peptonada (H_2Osp) e a Água Peptonada Tamponada (BPW).

Há casos especiais em que o diluente recomendado é diferente, devendo ser consultado o Anexo 2.2 para verificar essas exceções.

Como obter uma diluição inicial de 1:10 (10^{-1})

A diluição inicial recomendada para a maioria das amostras é de 1:10 (10^{-1}), adicionando-se ***m*** gramas ou mililitros da amostra para ***9*** x ***m*** mililitros do diluente. Por exemplo, para 25g de amostra, adicionar 9x25ml de diluente (225ml). A ISO 6887-1 (1999) recomenda que, para evitar injúrias aos microrganismos por choque térmico, a temperatura do diluente seja a mesma do ambiente. Há situações em que o diluente e a diluição inicial são diferentes, devendo ser consultado o Anexo 2.2 para verificar essas exceções.

Como obter uma diluição inicial diferente de 1:10

Há casos especiais em que a primeira diluição é diferente de 1:10. Para definir o volume de diluente necessário para obter uma determinada diluição ***1:k*** da amostra, usar a relação $v = [(k.m)-m]$. Por exemplo, para obter a diluição 1:50 de uma unidade analítica de 10g, adicionar [(50x10)-10] mililitros do diluente (490ml). Para obter a mesma diluição com uma unidade analítica de 20g, adicionar [(50x20)–20] mililitros do diluente (980ml).

Procedimento para o preparo da primeira diluição de amostras líquidas

No caso de alimentos líquidos, transferir a unidade analítica diretamente para os tubos ou frascos contendo a quantidade de diluente necessária para a diluição 1/10. Há casos especiais em que a diluição inicial é diferente, devendo ser consultado o Anexo 2.2 para verificar essas exceções.

Homogeneizar amostra com o diluente por agitação, invertendo a embalagem 25 vezes. Para permitir a homogeneização, utilizar tubos ou frascos com tampa de rosca. O tamanho deve ser suficiente para que não mais do que 2/3 da capacidade seja preenchida pela unidade analítica + diluente.

Procedimento para o preparo da primeira diluição de amostras sólidas ou líquidos concentrados

No caso de alimentos sólidos ou líquidos concentrados, transferir a unidade analítica para frascos ou bolsas de homogeneização estéreis, previamente tarados. Adicionar à amostra a quantidade de diluente necessária para a diluição 1:10. Há casos especiais em que a diluição inicial é

diferente, devendo ser consultado o Anexo 2.2 para verificar essas exceções.
Homogeneizar a unidade analítica com o diluente, o que pode ser feito por agitação com as mãos, invertendo o frasco em arco de 30cm em 7s (líquidos concentrados, pós solúveis), em homogeneizador peristáltico ("stomacher") por 1 a 2min (alimentos moles, pastosos, moídos, pós pouco solúveis) ou em liquidificador (alimentos duros). Na homogeneização em liquidificador o *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda usar alta rotação nos primeiros segundos e baixa (8000rpm) no tempo restante, que não deve ultrapassar 2min. Se for necessário uma homogeneização mais prolongada, é importante prevenir o excessivo aquecimento do material. Para isso, o *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda resfriar o diluente em banho de gelo, antes de usar, enquanto a ISO 6887-4 (2003/Cor.1:2004) recomenda não homogeneizar por mais do 2,5min de cada vez.

Procedimento para o preparo da primeira diluição de amostras obtidas por esfregaço de superfície ou por lavagem superficial

O diluente no qual foi recolhida a contaminação coletada com "swabs", esponjas ou lavagem superficial já é a primeira diluição da amostra. O tratamento subsequente de diluição decimal seriada é feito a partir dessa suspensão. Como a diluição inicial não é padrão de 1:10, considerar essa diferença no cálculo final dos resultados, conforme descrito nos Capítulos 3 e 4.

2.5. DILUIÇÃO DECIMAL SERIADA DA AMOSTRA

A preparação e inoculação de diluições seriadas da amostra é requerida nos ensaios quantitativos, para reduzir o número de microrganismos por unidade de volume, permitindo a contagem. Essa série de diluições geralmente é decimal, para facilitar o posterior cálculo dos resultados.

O número de diluições necessárias depende do nível de contaminação esperado e deve ser tal que permita, na contagem em placas, a obtenção de placas com número de colônias entre 25 e 250 (vide Capítulo 3) ou 15 e 150 na contagem de bolores e leveduras. Na contagem pelo método do Número Mais Provável (NMP) deve ser tal que permita a obtenção de tubos positivos nas menores diluições e negativos nas maiores (vide Capítulo 4).

No procedimento geral descrito pelo *Compendium* (Swanson *et al.*, 2001), a segunda diluição é iniciada logo após o término da primeira e a duração do procedimento completo, desde a preparação da primeira diluição até que todos os meios de cultura estejam inoculados, não deve exceder 15 minutos (exceto quando especificado nos capítulos específicos). No capítulo específico de bolores e leveduras (Beuchat & Cousin, 2001), o *Compendium* recomenda que alimentos de umidade intermediária sejam mantidos de molho no diluente por um certo período de tempo, antes da preparação da segunda diluição, para amolecer o produto e facilitar a liberação dos microrganismos presentes. No capítulo específico de enterococos (Hartman *et al.*, 2001), o *Compendium* recomenda uma diluição inicial de 1:1, com um período de repouso de uma hora sob refrigeração, antes de completar a diluição a 1:10 e as subseqüentes.

No procedimento geral descrito pela ISO 6887-1 (1999), a duração do procedimento completo não deve exceder 45 minutos e o intervalo entre o fim do preparo da primeira diluição e o início da segunda e subseqüentes não deve exceder 30 minutos (exceto quando especificado em procedimentos específicos).

A ISO 6887-4 (2003/Cor.1:2004) recomenda que, no caso de alimentos desidratados (exceto leite em pó, ovo em pó e fermento vivo em pó), a primeira diluição seja mantida em repouso por

30±5min, à temperatura ambiente (não maior que 25°C), antes de transferir o volume para a segunda diluição, para recuperação de injúrias ou "stress" provocados pelo processamento. Analogamente, a ISO 8261 (2001) recomenda que, no caso de produtos lácteos submetidos a tratamento térmico ou acidificação, a primeira diluição seja mantida em repouso por 45min, à temperatura ambiente (entre 20 e 25°C), antes de transferir o volume para a segunda diluição.

Em todas as transferências de volumes, a incerteza da medição não deve exceder 5% (ISO 6887-1, 1999). Utilizar pipetas com capacidade no máximo 10 vezes superior ao volume que vai ser coletado, uma pipeta diferente para cada diluição. Caso a ponta venha a tocar qualquer superfície não estéril, descartar e substituir por outra. Não flambar as pipetas. Encher completamente a pipeta e descarregar o volume a partir da marca superior, com a ponta encostada na parede interna do tubo ou frasco, de forma que o líquido escorra pela parede.

Como obter a segunda diluição (10^{-2})

Transferir asséptícamente 1ml da primeira diluição (10^{-1}) para 9ml de diluente. Os diluentes são os mesmos recomendados no Item 2.4 para a primeira diluição. Na segunda diluição não há casos especiais em que o diluente recomendado seja diferente.

Não mergulhar a pipeta numa profundidade superior a 1cm ao pipetar o volume da primeira para a segunda diluição (ISO 6887-1, 1999). Se a primeira diluição não contiver partículas em suspensão, o material pode ser agitado antes de transferir o volume da primeira para a segunda diluição. Se houver partículas em suspensão a ISO 6887-1 (1999) recomenda não agitar e aguardar que sedimentem no fundo do frasco, antes de transferir o volume. No caso de amostras viscosas, que aderem à parede interna da pipeta, a ISO 8261 (2001) recomenda descarregar o volume e depois lavar a pipeta com o diluente, aspirando e liberando o líquido várias vezes, para garantir que todo o material seja transferido para a segunda diluição.

Como obter as diluições subseqüentes

Proceder de maneira similar, transferindo-se 1ml da diluição anterior para 9ml de diluente. Antes de retirar o volume a ser transferido, agitar vigorosamente o tubo, invertendo 25 vezes em arco de 30cm (em 7s) ou com o auxílio de um agitador tipo "vortex" (15s).

2.6. REFERÊNCIAS

BEUCHAT, L.R. & COUSIN, M.A. Yeasts and molds. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 20, p.209-215.

DAVIS, G.L. & HICKEY, P.J. Media and dilution water preparation. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 4, p.93-101.

DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

DUNCAN, S.E., YAUN, B.R., SUMNER, S.S. Microbiological Methods for Dairy Products. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 9, p.249-268.

EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W. & GREENBERG, A.E. (Eds). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005.

FRANK, J.F. & YOUSEF, A.E. Tests for groups of microrganisms. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 8, p.227-248.

GRAY, R.J.H. & PINKAS, J.M. Gums and spices. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 52, p.533-540.

HALL, P., LEDENBACH, L., FLOWERS, R. Acid producing microorganisms. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 19, p.201-207.

HARTMAN, P.A., DEIBEL, R.H. & SIEVERDING, L.M. Enterococci. In: DOWNES, F. P. & K. ITO (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 9, p.83-87.

HUNT, M.E. & RICE, E.W. Microbiological examination. In: EATON *et al.* (Eds), *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000, p.9.1-9.169.

ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: *General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions, 1st ed.* The International Organization for Standardization, 1999.

ISO 6887-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 2: *Specific rules for the preparation of meat and meat products, 1st ed.* The International Organization for Standardization, 2003.

ISO 6887-3. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 4: *Specific rules for the preparation of fish and fishery products, 1st ed.* The International Organization for Standardization, 2003.

ISO 6887-4. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 4: *Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, and fish and fishery products, 1st ed.* The International Organization for Standardization, 2003. Corrigendum 1:2004.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs –*General requirements and guidance for microbiological examination, 3rd ed.* The International Organization for Standardization, 2007.

ISO 8261/IDF 122. *Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination 2nd ed.* The International Organization for Standardization, 2001.

ISO 17604. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Carcass sampling for microbiological analysis, 1st ed.* The International Organization for Standardization, 2003. Amendment 1: Sampling of poultry carcasses – 2009.

LAIRD, D.T., GAMBREL-LENARZ, S.A., SCHER, F.M. *et al.* Microbiological count methods. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 6, p.153-186.

MIDURA, T.F. & BRYANT, R.G. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 2, p.13-23.

RICKE, S.C., BIRKHOLD, S.G. & GAST, R.K. Egg and egg products. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 46, p.473-481.

SMITTLE, R.B. & CIRIGLIANO, M.C. Salad dressings. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 53, p.541-544.

SWANSON, K.M.J, PETRAN, R.L. & HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microrganisms. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 6, p.53-67.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE/FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. *Microbiology Laboratory Guidebook*, Chapter 4.03, October 2004. Disponível no site: http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp (acesso em 21/09/05).

WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004.

ANEXO 2.1

PROCEDIMENTOS PARA HOMOGENEIZAÇÃO DO CONTEÚDO E RETIRADA DA UNIDADE ANALÍTICA DE AMOSTRA DE DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTOS

Produtos em pó

Homogeneizar a amostra, agitando e invertendo a embalagem com as mãos, até misturar bem (ISO 6887-4, 2003/Cor. 1:2004) ou revolvendo o conteúdo com uma espátula ou bagueta estéril (Midura & Bryant, 2001). Se a embalagem não tiver espaço livre para homogeneização, transferir todo o conteúdo para um frasco maior e proceder da mesma forma (ISO 8261, 2001). Retirar a unidade analítica com uma espátula estéril.

Produtos pastosos ou moídos

Revolver o conteúdo com uma espátula ou bagueta estéril, para homogeneizar. Retirar a unidade analítica com uma espátula estéril ((Midura & Bryant, 2001).

Iogurtes com pedaços de frutas

Para iogurte com pedaços de frutas, o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Duncan *et al.*, 2004) recomenda homogeneizar todo o conteúdo da unidade de amostra em liqüidificador, por 1min, antes de retirar a unidade analítica.

Queijos

O *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Duncan *et al.*, 2004) recomenda macerar todo o conteúdo da unidade de amostra (com uma espátula estéril) e retirar a unidade analítica da mistura.

Produtos muito duros

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda colocar em uma bolsa plástica estéril e fragmentar em pequenas partes com um martelo estéril. Misturar bem a amostra fragmentada e retirar a unidade analítica com uma espátula estéril.

Peças de alimentos sólidos

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda usar um instrumento adequado (faca, tesoura estéril) para quebrar ou cortar pedaços menores (de diversos pontos da peça), até obter a quantidade requerida para a análise.

Ovos em casca

Para a análise do conteúdo interno o Capítulo 46 do *Compendium* (Ricke *et al.*, 2001) recomenda lavar a casca com escova, água e sabão, drenar o excesso de líquido, mergulhar em etanol 70% por 10min e flambar. Com luvas estéreis, abrir os ovos assépticamente e colocar o conteúdo interno num frasco ou bolsa estéril, separando a clara da gema, se a análise assim o exigir. Misturar bem e retirar a unidade analítica da mistura.

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda três procedimentos, dependendo da finalidade do ensaio:

- Para analisar apenas a contaminação externa, pode ser usado o procedimento da lavagem superficial. Alternativamente, quebrar os ovos, desprezar o conteúdo interno, colocar as cascas em uma bolsa estéril, quebrar as cascas, misturar bem e retirar a unidade analítica da mistura.
- Para analisar a contaminação externa e interna, quebrar os ovos, colocar as cascas e o conteúdo interno em um frasco ou bolsa estéril, misturar bem e retirar a unidade analítica da mistura.
- Para analisar apenas o conteúdo interno, limpar a casca com gaze molhada, secar com papel absorvente, mergulhar em solução de iodo e, com luvas estéreis, remover assépticamente os ovos da solução, deixando secar. Com luvas, abrir os ovos assépticamente e colocar o conteúdo interno num frasco ou bolsa estéril, separando a clara da gema, se a análise assim o exigir. Misturar bem e retirar a unidade analítica da mistura.

Cortes de carne para análise de contaminação não superficial

Para a análise de contaminação profunda de carcaças ou cortes de carne, a ISO 6887-2 (2003) recomenda expor uma área de aproximadamente 5x5cm, usando uma faca ou tesoura estéril para remover a pele (se presente) e uma camada superficial de aproximadamente 2mm. Cauterizar a superfície exposta com fogo e, com outra faca ou tesoura estéril, remover uma segunda camada de aproximadamente 1mm de profundidade e 4x4cm de área. A partir dessa região exposta, retirar a(s) unidade(s) analítica(s) requerida(s) para os ensaios.

Moluscos bivalves (ostra, mexilhão, lingueirão, berbigão, conquilha, ameijoa)

A ISO 6887-3 (2003) recomenda esfregar as conchas com uma escova abrasiva estéril, sob água corrente (potável). Drenar o excesso de água, colocar sobre uma superfície estéril e cobrir com papel absorvente estéril. Abrir assépticamente as conchas e então recolher os organismos (pelo menos seis) e o líquido que escorre do interior das conchas em um frasco ou bolsa plástica estéril. Lavar e desinfetar bem as mãos antes de iniciar o procedimento.

Moluscos gastrópodes (caracol, caramujo, búzio, lapa, apa, lesma)

A ISO 6887-3 (2003) recomenda esfregar as conchas com uma escova abrasiva estéril, sob água corrente (potável). Desinfetar com álcool 70%, colocar sobre uma superfície estéril e cobrir com papel absorvente estéril. Quebrar a concha com um martelo estéril e retirar a carne assépticamente, recolhendo em uma bolsa ou frasco estéril. Lavar e desinfetar bem as mãos antes de iniciar o procedimento.

Moluscos cefalópodes (polvo, lula)

A ISO 6887-3 (2003) recomenda remover a pele e retirar a unidade analítica dos músculos dorsais e dos tentáculos.

Caranguejos e lagostas

A ISO 6887-3 (2003) recomenda quebrar a casca com um martelo estéril e remover o máximo da carne na retirada da unidade analítica.

Ouriços do mar

A ISO 6887-3 (2003) recomenda lavar os organismos em água corrente (potável), abrir o lado ventral e retirar toda a carne e fluído internos com uma espátula.

ANEXO 2.2

CASOS ESPECIAIS EM QUE HÁ VARIAÇÕES NA UNIDADE ANALÍTICA E/OU DILUIÇÃO E/OU DILUENTES RECOMENDADOS PARA A PREPARAÇÃO DA PRIMEIRA DILUIÇÃO DE AMOSTRAS DE DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTOS

Líquidos com baixa contaminação

Nos ensaios quantitativos de amostras líquidas com baixa contagem microbiana, é comum inocular uma alíquota da amostra diretamente nos meios de cultura, sem diluição. Nesse caso, a primeira diluição pode ser feita inoculando-se 1ml da amostra em 9ml do diluente. Também são comuns os ensaios usando a técnica de filtração em membrana, inoculando-se um volume maior da amostra, sem qualquer diluição.

Alimentos gordurosos

Para esses alimentos o *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) recomenda suplementar o diluente com 1% (P/V) de Tergitol-7 Aniônico ou equivalentes (Tween 80, por exemplo) e homogeneizar em liquidificador por 2min, em baixa rotação (8000rpm).

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda suplementar o diluente com 1 a 10g/l de Tween 80, dependendo do teor de gordura. Para produtos com 40% de gordura, por exemplo, suplementar com 4g/l de Tween 80. Esse procedimento não se aplica a margarina e "spreads".

Para margarina e "spreads" a ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda unidade analítica de 40g e o seguinte procedimento: adicionar à unidade analítica um volume de diluente (sem suplementos) proporcional ao teor de gordura da margarina. Por exemplo, para margarinas com 82% de gordura e unidade analítica de 40g, adicionar 40 x 0,82 = 33ml de diluente. Colocar o frasco em banho maria com temperatura controlada a 45°C, até a fusão do material. Esse período não deve exceder 20min. Misturar com um agitador magnético até formar uma emulsão homogênea, o que pode levar de 2 a 5min, dependendo do tipo de produto. Deixar descansar à temperatura ambiente até a completa separação das fases aquosa (inferior) e gordurosa (superior). Continuar a análise com a fase aquosa, na qual 1ml corresponde a 1g de margarina. Preparar então a diluição 10^{-1} adicionando, para cada *m* mililitros de fase aquosa, *9m* mililitros de diluente.

O *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Laird *et al.*, 2004) recomenda, para margarina e "spreads", o mesmo procedimento descrito para manteiga.

Espessantes ou produtos com antimicrobianos naturais

Para espessantes e outros produtos que aumentam de viscosidade em água (gomas, pectina, celulose, condimento desidratados em folhas, como orégano) o *Compendium* (Gray & Pinkas,

2001) e a ISO 6887-1 (1999) recomendam trabalhar com diluição inicial maior do que 1:10, podendo ser 1/20, 1/50, 1/100 ou outra adequada à viscosidade do material.

Para produtos que contém compostos antimicrobianos naturais, como condimentos (alho, cebola, cravo, canela, orégano, pimenta) e certos chás e café, recomenda-se que a primeira diluição seja maior do que 1:10 (1:100 para orégano e canela, 1:1000 para cravo). Alternativamente, pode-se adicionar 0,5% sulfito de potássio (K_2SO_3) ao diluente e trabalhar com a diluição inicial normal.

A unidade analítica pode ser de 10g e a diluição inicial utilizada deve ser levada em conta no cálculo dos resultados. Se as contagens esperadas são baixas, deve-se manter, se possível, a inoculação de 0,1g nos meios de cultura. Para isso, seguir as orientações dos Capítulos 3 e 4.

Produtos ácidos

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda que o pH da primeira diluição seja neutralizado com NaOH estéril. Para facilitar essa etapa, pode-se adicionar ao diluente (Água Salina Peptonada), 0,1ml/l de uma solução alcoólica de púrpura de bromocresol a 0,04%. Na adição do NaOH, a elevação do pH pode ser acompanhada pela alteração de cor do meio que, muda de amarelo para roxo em pH 6,8 (neutro). A concentração do NaOH (01M ou 1M, por exemplo) a ser usada depende da acidez da amostra e deve ser tal que a quantidade adicionada não altere significativamente a proporção 1 + 9 entre amostra e diluente. Uma segunda opção é usar diluentes tamponados mas, mesmo assim, a adição de NaOH freqüentemente é necessária, para aumentar a capacidade tamponante do meio.

O Capítulo 2 do *Compendium* (Midura & Bryant, 2001) não faz menção a procedimentos diferenciados para essas amostras, para os ensaios gerais de quantificação. Entretanto, para amostras de maionese e outros molhos para saladas, o Capítulo 53 (Smittle & Crigliano, 2001) recomenda que sejam neutralizadas para a contagem de coliformes e *S. aureus*. Vide também as recomendações específicas para produtos lácteos fermentados.

Farinhas, cereais, ração animal

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda adicionar o diluente à unidade analítica, manter em repouso por 20 a 30min à temperatura ambiente e então homogeneizar. Se a viscosidade da suspensão aumentar muito, dificultando a homogeneização e a transferência de volumes, adicionar uma quantidade adicional de diluente, até diluição 1:20. Considerar essa alteração da diluição inicial no cálculo dos resultados.

Chocolate em barras, bombons

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda pré aquecer o diluente a 40°C, adicionar à unidade analítica e misturar por agitação manual. Manter em repouso por 20-30min à temperatura ambiente, até a fusão do material, homogeneizando então em "stomacher".

Clara de ovos

O *Compendium* (Midura & Bryant, 2001, Ricke *et al.*, 2001) não faz menção a procedimentos diferenciados para essas amostras.

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004) recomenda que a primeira diluição seja 1:40, em Água Peptonada Tamponada (BPW), para reduzir a inibição causada pela lisozima natural sobre os microrganismos. A diluição inicial utilizada deve ser levada em conta no cálculo dos resultados.

Produtos fermentados contendo microrganismos vivos destinados à quantificação da microbiota contaminante (exceto probióticos)

A ISO 6887-4 (2003/Cor. 1:2004), para a determinação de outros microrganismos que não os responsáveis pela fermentação (os contaminantes), recomenda usar como diluente a Água Salina Peptonada suplementada com 0,1ml/l de uma solução alcoólica de púrpura de bromocresol a 0,04%. Se a cor do diluente na primeira diluição indicar pH ácido (cor amarela), adicionar 40g/l de hidróxido de sódio, para retornar ao pH neutro (viragem para roxo). Se os microrganismos responsáveis pela fermentação forem leveduras, adicionar ao meio de cultura onde será feita a contagem um agente antifúngico com a cicloeximida (50mg/Kg), a nistatina (50mg/Kg) ou a anfotericina (10mg/Kg). Para outros microrganismos responsáveis pela fermentação, adicionar um outro antibiótico, que seja adequado para inibir essa microbiota. Essas modificações no procedimento, se usadas, devem ser relatadas no laudo de resultados.

Produtos lácteos em pó (leite, soro de leite, creme de leite, lactose, fórmulas infantis)

A ISO 8261 (2001) recomenda unidade analítica de 10g e que o pó seja adicionado ao diluente, não o diluente ao pó (para facilitar a hidratação). A homogeneização pode ser manual (inverter o frasco em arco de 30cm em 7 segundos) ou em "stomacher". São recomendados os seguintes diluentes, que devem ser pré aquecidos a 45°C antes do uso:

- Para soro de leite doce, creme de leite, lactose e fórmulas infantis – 90ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op), Água Peptonada Tamponada (BPW) ou Água Salina Peptonada (H_2Osp).
- Para soro de leite ácido – 90ml de solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 8,4±0,2
- Para leite em pó (secagem em rolo) – 90ml de solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 7,5±0,2 ou solução de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) 2%.

Para pós com baixa solubilidade o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Laird *et al.*, 2004) recomenda solução de citrato de sódio 2% com pH ajustado abaixo de 8,0.

Manteiga

A ISO 8261 (2001) recomenda pesar uma unidade analítica de 10g em um frasco estéril, transferir para um banho-maria regulado a 45°C, aguardar a fusão da amostra, adicionar 90ml de Água Peptonada 0,1% e homogeneizar em "stomacher".

O Capítulo 6 da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Laird *et al.*, 2004) recomenda fundir a amostra em banho a 40±1ºC, por não mais de 15min. Pré aquecer o diluente a 40-45ºC e pipetar o diluente várias vezes, retornando ao frasco, para aquecer a pipeta. Pipetar então 11ml da amostra fundida (evitar a separação das fases aquosa e gordurosa), transferir para 99ml do diluente aquecido e agitar, invertendo o frasco em arco de 30cm, 25 vezes em sete segundos. Preparar e inocular as diluições seriadas imediatamente, com os tubos de diluente também aquecidos.

Produtos lácteos congelados

A ISO 8261 (2001) recomenda pesar uma unidade analítica de 10g em um frasco estéril, transferir para um banho-maria regulado a 30°C, aguardar a fusão da amostra, adicionar 90ml de Água Peptonada 0,1% e homogeneizar por agitação ou em "stomacher".

O *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Duncan *et al.*, 2004) recomenda, para sorvetes e outras sobremesas lácteas congeladas, pesar uma unidade analítica de 11g em um

frasco estéril, adicionar 99ml de Tampão Fosfato pH 7,2 (PB), transferir para um banho-maria regulado a 40°C, aguardar a fusão da amostra (não mais do que 15min) e homogeneizar por agitação ou em "stomacher".

Queijos

A ISO 8261 (2001) recomenda unidade analítica de 10g e, como diluente, 90ml de solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 7,5±0,2 ou de solução de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) 2%.

O *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Laird *et al.*, 2004) recomenda unidade analítica de 11g e, como diluente, 99ml de solução de citrato de sódio 2%, pré aquecida a 40-45°C.

Produtos lácteos fermentados

A ISO 8261 (2001) recomenda unidade analítica de 10g e, como diluente, 90ml de solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 7,5±0,2. Homogeneizar em "stomacher". Para produtos destinados à contagem de bactérias lácticas, o Capítulo 19 do *Compendium* (Hall *et al.*, 2001) e o Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004) destacam que não deve ser utilizado Tampão Fosfato na preparação das amostras, porque pode causar injúrias às células. O diluente recomendado, de maneira geral, é a Água Peptonada 0,1%.

Para leites e creme fermentados, em particular, o Capítulo 9 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Duncan *et al.*, 2004) recomenda unidade analítica de 11g e, como diluente, 99ml de água destilada estéril ou solução de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) 2%, pré aquecidas a 40-45°. Para iogurte e outros produtos fermentados ou acidificados (exceto leite e creme), recomenda unidade analítica de 10g e, como diluente, 90ml de leite em pó desnatado dissolvido em Tampão Fosfato (0,1g/100ml).

Caseína e caseinatos

A ISO 8261 (2001) recomenda unidade analítica de 10g e 90ml dos seguintes diluentes:

- Caseinatos - solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 7,5±0,2.
- Caseína láctica ou ácida - solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 8,4±0,2 e suplementado com anti espumante.
- Paracaseína (obtida por coagulação com renina) - solução de fosfato de potássio (K_2HPO_4) 2% com pH ajustado em 7,5±0,2 e suplementado com anti espumante. Adicionar o diluente à amostra, misturar bem, deixar descansar por 15min à temperatura ambiente e homogeneizar em "stomacher" por 2min. Deixar descansar por mais 5min antes de preparar as diluições subsequentes.

Paracaseína com problemas de solubilidade

A ISO 8261 (2001) recomenda moer aproximadamente 20g da amostra, retirar uma unidade analítica de 5g, transferir para um frasco com pérolas de vidro e adicionar 95ml de solução de tripolifosfato ($Na_3O_{10}P_3$) 2% pré aquecida a 37°. Agitar em "shaker" por 15min, transferir para um banho-maria regulado a 37°C e manter no banho por mais 15min, agitando periodicamente para facilitar a homogeneização.

Moluscos (bivalves e gastrópodes) e ouriços do mar

Para moluscos bivalves (ostra, mexilhão, lingueirão, berbigão, conquilha, ameijoa) e moluscos gastrópodes (caracol, caramujo, búzio, lapa, apa, lesma) e ouriços do mar (*Echinoidae*), a ISO 6887-3 (2003) recomenda unidade analítica de seis organismos inteiros e diluição inicial de 1:2, adicionado uma parte da amostra para 2 partes de diluente (Água Peptonada 0,1%, Água Salina Peptonada ou Água Peptonada Tamponada). Homogeneizar em liquidificador por 30s a 2min, transferir para uma bolsa estéril e completar a diluição até 1:10 com o mesmo diluente, homogeneizando em "stomacher".

Pepinos do mar(*Holothuroidea*) e tunicados ou ascídias (*Ascidiacea*)

A ISO 6887-3 (2003) recomenda cortar os organismos em pequenos pedaços, preparar uma diluição inicial de 1:2, adicionado uma parte da amostra para 2 partes de diluente (Água Peptonada 0,1%, Água Salina Peptonada ou Água Peptonada Tamponada), homogeneizar em liquidificador por 30s a 2min, transferir para uma bolsa estéril e completar a diluição até 1:10 com o mesmo diluente.

Capítulo 3

Técnicas Básicas de Contagem de Microrganismos em Placas

3.1. INTRODUÇÃO

A maioria das orientações contidas nesse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (Swanson *et al.*, 2001). Quando diferentes ou complementares às do *Compendium*, foram também incluídas orientações das normas ISO 6887-1 (1999) e ISO 7218 (2007), recomendadas para ensaios realizados com metodologia da International Organization for Standardization.

A análise microbiológica de alimentos é predominantemente cultural, objetivando a detecção ou a enumeração de microrganismos vivos. Em função da multiplicidade de grupos, gêneros e espécies que podem estar presentes, um grande número de ensaios são utilizados, que podem ser de dois tipos: ensaios qualitativos, que verificam a presença ou ausência do(s) microrganismo(s) alvo em uma dada quantidade da amostra, sem quantificar, e ensaios quantitativos, que determinam a quantidade do(s) microrganismo(s) alvo na amostra, geralmente por unidade de massa ou volume. Cada um desses ensaios segue procedimentos diferenciados, que dependem do(s) microrganismo(s) alvo, mas a maioria deles utiliza as mesmas técnicas culturais básicas de microbiologia. Essas técnicas são a detecção da presença/ausência (Capítulo 5), a contagem do Número Mais Provável (NMP) (Capítulo 4) e a contagem padrão em placas, descrita nesse capítulo.

A contagem padrão em placas é utilizada tanto para a quantificação de grandes grupos microbianos, como os aeróbios mesófilos, os aeróbios psicrotróficos, os bolores e leveduras, os clostrídios sulfito redutores, os enterococos e as bactérias lácticas, como também para gêneros e espécies em particular, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*. O procedimento básico é a inoculação da amostra homogeneizada (e suas diluições) em um meio sólido (com ágar), contido em placas de Petri, seguida da incubação das placas até crescimento visível. A versatilidade da técnica é decorrente do princípio envolvido na contagem, baseado na premissa de que, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, cada célula microbiana presente na amostra irá formar uma colônia isolada. Variando-se o tipo de meio de cultura (meio de enriquecimento, meio seletivo, meio seletivo-diferencial) e as condições de incubação (temperatura e atmosfera), é possível selecionar o grupo, gênero ou espécie que se deseja contar. Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos (pares, tétrades, cachos, cadeias, etc.), não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. Essa correlação é feita entre o número de colônias e o número de "Unidades Formadoras de Colônias" (UFC), que podem ser tanto células individuais como agrupamentos característicos de certos microrganismos. Para a homogeneização da amostra e preparo das diluições, são utiliza-

dos os procedimentos descritos no Capítulo 2. Para a inoculação no meio de cultura, chamada de plaqueamento, podem ser utilizados quatro procedimentos básicos: a) o plaqueamento em profundidade (pour plate), b) o plaqueamento em superfície (spread plate), c) o plaqueamento em gotas (drop plate) ou d) a filtração em membrana.

3.2. PLAQUEAMENTO EM PROFUNDIDADE (POUR PLATE)

O procedimento padrão de plaqueamento em profundidade, descrito abaixo, tem limite de detecção de 10 UFC/g para produtos sólidos ou 1 UFC/ml para produtos líquidos. Esse procedimento pode ser adaptado, se necessário, para limite de detecção de 1 UFC/g para produtos sólidos. Suas principais aplicações são os ensaios de contagem total de aeróbios mesófilos, contagem de clostrídios sulfito redutores, contagem de enterobactérias, contagem de enterococos e contagem de bactérias lácticas. Apresenta algumas limitações, a principal delas sendo a necessidade de fusão do meio de cultura antes do uso. Alguns meios, suplementados com componentes sensíveis ao calor depois da esterilização, não podem ser reaquecidos para fusão do ágar antes do uso.

3.2.1. MATERIAL REQUERIDO NAS ANÁLISES

- Material para preparação da amostra e diluições seriadas, descritos no Capítulo 2
- Meio de cultura recomendado para o ensaio a ser realizado, descrito nos capítulos específicos
- Placas de Petri de 20 x 100mm estéreis vazias
- Estufa incubadora regulada na temperatura especificada pelo ensaio a ser realizado, descrito nos capítulos específicos

3.2.2. PROCEDIMENTO

Antes de iniciar o procedimento, observar os cuidados descritos no Capítulo 2, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas. Identificar todos os tubos e placas que serão inoculados, com o código da amostra, a diluição e a sigla do meio de cultura contido. Fundir os meios de cultura em banho com água fervente, mantendo a fervura apenas o tempo necessário para a fusão do ágar. Resfriar imediatamente em água fria e manter à temperatura de 44 a 46°C até o momento do uso (em banho ou estufa com temperatura controlada).

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Geralmente a inoculação é feita para vários ensaios simultaneamente. Para cada ensaio que estiver sendo conduzido, selecionar três diluições adequadas da amostra (vide notas abaixo) e inocular 1ml de cada diluição em placas de Petri separadas, estéreis e vazias, abrindo as placas apenas o suficiente para inserir a pipeta. Trabalhar em uma capela de fluxo laminar ou próximo à chama de um bico de Bunsen. Depositar o inóculo fora do centro da placa, pois isto facilitará a posterior mistura com o meio de cultura. Posicionar a pipeta em em ângulo de aproximadamente 45° e tocando o fundo da placa. Utilizar uma pipeta diferente para cada diluição, com capacidade de, no máximo, 10ml. A incerteza da medição dos volumes não deve exceder 5% (ISO 6887-1, 1999). Observar criteriosamente se a placa utilizada corresponde à amostra e à diluição que estão sendo inoculadas. Mudar as placas de posição, à medida que sejam inoculadas, para não inocular a mesma placa mais de uma vez ou deixar alguma placa sem inocular.

Nota b.1) Selecionar as diluições em função do nível de contaminação estimado da amostra, de forma a obter placas com 25 a 250 colônias. Se o nível de inóculo esperado estiver na faixa de 2.500 a 25.000 UFC/g ou ml, por exemplo, as diluições recomendadas são a 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, que correspondem a 0,1 – 0,01 e 0,001g ou ml da amostra. Se a contaminação esperada estiver acima dessa faixa, deve-se inocular diluições mais altas. Se estiver abaixo, no caso de produtos líquidos é possível inocular 1ml da amostra sem diluição e 1ml das duas diluições subseqüentes. No caso de produtos sólidos não é possível inocular a amostra sem diluição, mas pode-se inocular até 2ml da diluição inicial em uma mesma placa, ou um volume maior, distribuído em várias placas (2ml/placa). Caso não seja possível estimar previamente o nível de contaminação da amostra, recomenda-se inocular mais do que três diluições, partindo-se da diluição inicial.
Nota b.2) Na análise de alguns alimentos, a diluição inicial recomendada é maior do que 1:10 (vide Capítulo 2). Se as contagens esperadas nesses produtos são baixas, deve-se aumentar o volume inoculado da diluição inicial, da mesma forma descrita na Nota b.1. Utilizando essa técnica, deve-se manter, se possível, a inoculação de 0,1g de produtos sólidos ou 1ml de produtos líquidos.
Nota b.3) Para aumentar a precisão das contagens recomenda-se não utilizar pipetas com capacidade maior do que 2ml para liberar os volumes de 1ml. Pode-se também inocular duas placas por diluição (duplicata).
Nota b.4) A ISO 7218 (2007) não exige a inoculação de três diluições da amostra, nem duas placas por diluição. Estabelece duas diluições sucessivas, sem duplicata, ou duplicata se for usada apenas uma diluição. Entretanto, a forma de cálculo dos resultados é um pouco diferente (vide item 3.7).

c) Adição do meio de cultura. Para cada ensaio que estiver sendo conduzido, retirar o meio de cultura do banho ou estufa a 44-46°C e, se o frasco estiver molhado, secar com papel toalha, para evitar respingos nas placas, no momento do plaqueamento. Evitar agitação e movimentos bruscos do frasco, para não formar bolhas. Verter 12 a 15ml do meio nas placas inoculadas, observando criteriosamente se a identificação das placas corresponde ao meio de cultura utilizado. Misturar o meio com o inóculo, movimentando suavemente as placas, numa superfície plana, em movimentos na forma de oito ou em movimentos circulares, oito a dez vezes no sentido horário e oito a dez vezes no sentido anti-horário. A movimentação das placas deve ser feita cuidadosamente, para evitar respingos de meio nas bordas ou nas tampas. Para facilitar esta etapa do trabalho, utilizar preferencialmente placas altas (20 x 100mm). As placas podem ser empilhadas durante a adição do meio e a homogeneização com o inóculo, mas, em seguida, devem ser distribuídas numa bancada fria, para acelerar o resfriamento e a solidificação do meio.
Nota c.1) Quando vários ensaios estiverem sendo conduzidos simultaneamente, as atividades e o trabalho em equipe devem ser programados de forma a obedecer as seguintes condições, estabelecidas pelo *Compendium* (Swanson et al., 2001): o tempo decorrido entre o depósito do inóculo em uma placa e a adição do meio de cultura não deve ultrapassar 10 minutos, para evitar o ressecamento e aderência do inóculo às placas. A mistura do meio de cultura com o inóculo deve ser feita imediatamente após a adição do meio, para não haver risco de solidificação do ágar. Além disso, na recomendação do *Compendium* a duração do procedimento completo, desde a preparação da primeira diluição até que todos os meios de cultura estejam inoculados, não deve exceder 20 minutos. Na recomendação da ISO 6887-1 (1999), a duração do procedimento completo não deve exceder 45 minutos.
Nota c.2) Alguns alimentos contendo partículas (farinhas, por exemplo) podem dificultar a visualização das colônias na primeira diluição, confundidas com as partículas. Para evitar esse problema, pode-se adicionar TTC (2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio) ao meio de cultura, pois a maioria das bactérias formam colônias vermelhas na presença do TTC. Para cada 100ml de meio, adicionar 0,5ml da solução aquosa 1% de TTC, previamente esterilizada por filtração.

d) Incubação. Aguardar a completa solidificação do meio de cultura, inverter as placas e incubar nas condições de temperatura, tempo e atmosfera especificadas para cada ensaio. O meio de cultura deve atingir a temperatura de incubação no intervalo máximo de duas horas. Evitar o empilhamento excessivo das placas e não encher demasiadamente as estufas incubadoras, para garantir a distribuição homogênea da temperatura. Num intervalo de 48h de incubação, as placas não podem perder mais do que 15% do seu peso por ressecamento. Umidade excessiva também é indesejável, porque aumenta o risco de espalhamento. Dependendo da temperatura, o controle da umidade nas estufas pode ser necessário.

e) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Seguir as orientações do item 3.6.1.

3.3. PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE (SPREAD PLATE)

A principal diferença do plaqueamento em superfície, em relação ao plaqueamento em profundidade, é que a amostra e/ou suas diluições são inoculadas diretamente na superfície do meio sólido, já distribuído em placas. A inoculação superficial é considerada vantajosa sob alguns aspectos, pois não expõe os microrganismos ao calor do meio fundido, permite a visualização de características morfológicas e diferenciais de colônias, facilita a transferência de colônias, permite a utilização de meios que não podem ser fundidos depois de prontos e não exige que os meios sejam translúcidos. Sua principal desvantagem é que o volume inoculado é limitado à capacidade de absorção de líquido pelo meio de cultura, que não permite a inoculação de mais do que 0,5ml por placa. O procedimento padrão é a inoculação de 0,1ml/placa de cada diluição, com limite de detecção de 100 UFC/g para produtos sólidos ou 10 UFC/ml para produtos líquidos. Esse procedimento pode ser adaptado, se necessário, para limite de detecção de 10 UFC/g para produtos sólidos ou 1 UFC/ml para produtos líquidos. Suas principais aplicações são os ensaios de contagem total de aeróbios psicrotróficos, contagem de bolores e leveduras, contagem de *S. aureus* e contagem de *B. cereus*.

3.3.1. MATERIAL REQUERIDO NAS ANÁLISES

- Material para preparação da amostra e diluições seriadas, descritos no Capítulo 2
- Placas de Petri contendo o meio recomendado para o ensaio, descrito nos capítulos específicos
- Alça de espalhamento (alça de Drigalski) mergulhada em etanol 70%
- Estufa incubadora regulada na temperatura especificada pelo ensaio a ser realizado, descrito nos capítulos específicos

3.3.2. PROCEDIMENTO

Assim como recomendado no plaqueamento em profundidade, observar os cuidados descritos no Capítulo 2, antes de iniciar o procedimento, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas. Identificar todos os tubos e placas que serão inoculados, com o código da amostra, a diluição e a sigla do meio de cultura contido. Preparar previamente as placas e secar em capela de fluxo laminar (30-60min, com as tampas parcialmente abertas) ou em estufa (50°C/1,5-2h ou 25-30°C/18-24h).

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Geralmente a inoculação é feita para vários ensaios simultaneamente. Para cada ensaio que estiver sendo conduzido, selecionar três diluições adequadas da amostra para a inoculação (vide nota b.1). Com uma pipeta de no máximo 1ml (divisões de 0,1 em 0,1ml), inocular 0,1ml de cada diluição na superfície das placas previamente preparadas. Observar criteriosamente se a placa utilizada corresponde à amostra e à diluição que estão sendo inoculadas e se contém o meio de cultura correto. Mudar as placas de posição, à medida que sejam inoculadas, para não inocular a mesma placa mais de uma vez ou deixar alguma sem inocular. Trabalhar em uma capela de fluxo laminar ou próximo à chama de um bico de Bunsen. O mais rápido possível, espalhar o inóculo por toda a superfície do meio, com uma alça de Drigalski, até que o excesso de líquido seja absorvido. Usar uma alça para cada placa ou fazer o espalhamento da placa de maior para a placa de menor diluição, flambando a alça com etanol 70%, entre uma placa e outra. Resfriar a alça na parte interna da tampa da placa antes de colocá-la em contato com o inóculo

Nota b.1) Assim como no plaqueamento em profundidade, selecionar as diluições em função do nível de contaminação estimado da amostra, de forma a obter placas com 25 a 250 colônias. Considerar, entretanto, que o volume inoculado é dez vezes menor. Para amostras com nível baixo de contaminação pode-se inocular um volume maior da primeira diluição, distribuindo esse volume por várias placas. A distribuição mais comumente utilizada é três placas com 0,3ml e uma placa com 0,1ml. No espalhamento das placas com 0,3ml, o tempo requerido para a absorção do líquido é maior, exigindo cuidados para que não permaneçam filmes de umidade na superfície, com a conseqüente formação de zonas de espalhamento.

Nota b.2) Na análise de alguns alimentos, a diluição inicial recomendada é maior do que 1:10 (vide Capítulo 2). Se as contagens esperadas nesses produtos são baixas, deve-se aumentar o volume inoculado da diluição inicial, da mesma forma descrita na Nota b.1. Utilizando essa técnica, deve-se manter, se possível, a inoculação de 0,01g de produtos sólidos ou 0,1ml de produtos líquidos.

Nota b.3) Quando vários ensaios estiverem sendo conduzidos simultaneamente, as atividades e o trabalho em equipe devem ser programados de forma a obedecer as seguintes condições, estabelecidas pela APHA (2001): a duração do procedimento completo, desde a preparação da primeira diluição até que todos os meios de cultura estejam inoculados, não deve exceder 20 minutos e o espalhamento do inóculo na superfície do meio deve ser iniciado imediatamente após a inoculação das três diluições da amostra. Na recomendação da ISO 6887-1 (1999), a duração do procedimento completo não deve exceder 45 minutos.

Nota b.4) Para aumentar a precisão das contagens recomenda-se não utilizar pipetas com capacidade maior do que 1ml para liberar os volumes de 0,1ml.

Nota b.5) A ISO 7218 (2007) não exige a inoculação de três diluições da amostra, estabelece duas diluições sucessivas, sem duplicata, ou duplicata se for usada apenas uma diluição.Entretanto, a forma de cálculo dos resultados é um pouco diferente (vide item 3.7)

c) Incubação. Seguir as mesmas orientações descritas para o plaqueamento em profundidade.

d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Seguir as orientações do item 3.6.2.

3.4. PLAQUEAMENTO EM GOTAS (DROP PLATE)

O plaqueamento em gotas é uma técnica de inoculação em superfície, com as mesmas vantagens do plaqueamento em superfície. A principal diferença é que o inóculo não é espalha-

do, mas sim, depositado no meio de cultura, em gotas de 0,01ml. Como as gotas ocupam um espaço mínimo, é possível inocular, numa mesma placa, três diluições em triplicata, três gotas por diluição. Isso torna a técnica extremamente econômica, com limite de detecção de 1.000 UFC/g de produtos sólidos ou 100 UFC/ml de produtos líquido. Não é uma técnica rotineiramente utilizada na análise de alimentos, mas pode ser muito útil em situações que exijam a inoculação de um número grande de diluições.

3.4.1. MATERIAL REQUERIDO NAS ANÁLISES

- Material para preparação da amostra e diluições seriadas, descritos no Capítulo 2
- Pipetas graduadas de 0,1ml estéreis ou pipetadores de ponteiras descartáveis, para liberação das gotas
- Placas de Petri contendo o meio recomendado para o ensaio, descrito nos capítulos específicos
- Estufa incubadora regulada na temperatura especificada pelo ensaio a ser realizado, descrito nos capítulos específicos

3.4.2. PROCEDIMENTO

Assim como recomendado no plaqueamento em profundidade, observar os cuidados descritos no Capítulo 2, antes de iniciar o procedimento, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas. Identificar todos os tubos e placas que serão inoculados, com o código da amostra, a diluição e a sigla do meio de cultura contido. Preparar previamente as placas com os meios de cultura e secar em estufa por 24 horas a 25-30°C.

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2, porém, preparar o diluente suplementado com 0,1% de ágar, para facilitar a posterior fixação das gotas na superfície do meio de cultura.

b) Inoculação. Dividir a placa em 9 setores, marcando o fundo com caneta vidrográfica (três linhas horizontais e três linhas verticais). Para cada ensaio que estiver sendo conduzido, selecionar três diluições adequadas da amostra para a inoculação (vide nota b.1 abaixo). Antes de coletar o volume de cada diluição, para a inoculação nas placas, não esquecer de agitar vigorosamente os tubos de diluição, invertendo 25 vezes em arco de 30cm, ou com o auxílio de um agitador tipo "vortex". Utilizando pipetas graduadas de 0,1ml (divisões de 0,01 em 0,01ml) ou pipetadores de ponteiras descartáveis, depositar três gotas de 0,01ml de cada diluição em três quadrados adjacentes da placa (triplicata). Esse procedimento deve ser feito com cuidado, para que as gotas não escorram para fora dos respectivos quadrados. Não espalhar as gotas. Mantendo as placas numa superfície plana, aguardar que o líquido seja absorvido pelo meio de cultura, o que requer aproximadamente 30 minutos.

> **Nota b.1)** Selecionar as diluições em função do nível de contaminação estimado da amostra, de forma a obter gotas com 30 colônias, no máximo. Considerar, entretanto, que o plaqueamento em gotas não se aplica a amostras com nível de contaminação abaixo de 1.000 UFC/g ou 100 UFC/ml. A primeira razão desta limitação é o pequeno volume inoculado e a segunda é a capacidade da pipeta, que não permite a transferência de líquidos viscosos ou com sólidos em suspensão, comum nas duas primeiras diluições de alimentos sólidos. Pode, entretanto, ser utilizado para amostras com nível mais baixo de contaminação, se a finalidade do ensaio não for quantificar, mas sim, comprovar que a contagem encontra-se abaixo desse limite.

c) Incubação. Aguardar a completa absorção do líquido das gotas pelo meio de cultura e incubar nas mesmas condições recomendadas para o plaqueamento em profundidade.

d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Seguir as orientações do item 3.6.3.

3.5. FILTRAÇÃO EM MEMBRANA

O procedimento de filtração em membrana é limitado à analise de amostras líquidas límpidas, sem sólidos em suspensão, que possam ser filtradas através de uma membrana de poro 0,45mm. Sua principal vantagem é que permite a inoculação de maiores volumes da amostra, concentrando na membrana os microrganismos presentes na quantidade inoculada. O limite de detecção é de 1 UFC por volume inoculado, sendo indicado para amostras com contagens abaixo do limite de detecção dos outros procedimentos. Suas principais aplicações são os ensaios de contagem total de aeróbios mesófilos, contagem de bolores e leveduras, contagem de bactérias lácticas, contagem de enterococos e contagem de coliformes totais/fecais/*E. coli* em água, refrigerantes, outros produtos líquidos e produtos sólidos que possam ser transformados numa solução límpida, como sal e açúcar, por exemplo.

3.5.1. MATERIAL REQUERIDO NAS ANÁLISES

- Material para preparação da amostra e diluições seriadas, descritos no Capítulo 2
- Proveta de 100 ou 200ml estéril, para medição de volumes de amostra
- Conjunto de filtração previamente esterilizado
- Bomba de vácuo
- Membranas de 47mm de diâmetro, porosidade de 0,45mm, brancas e quadriculadas
- Pinças para transferência das membranas, mergulhadas em etanol
- Placas de Petri contendo o meio recomendado para o ensaio, descrito nos capítulos específicos
- Placas estéreis vazias e almofadas estéreis ("pads") opcionais para uso dos meios na forma de caldo
- Estufa incubadora regulada na temperatura especificada pelo ensaio a ser realizado, descrito nos capítulos específicos

3.5.2. PROCEDIMENTO

Assim como recomendado no plaqueamento em profundidade, observar os cuidados descritos no Capítulo 2, antes de iniciar o procedimento, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas. Identificar todos os tubos e placas que serão inoculados, com o código da amostra, a diluição e a sigla do meio de cultura contido.

a) Preparação do conjunto de filtração. O conjunto de filtração é composto de um porta filtro, um kitasato e um copo de filtração. O porta filtro é um tipo de funil cuja parte superior é plana, para acomodar o filtro membrana e, sobre essa, o copo de filtração, preso por uma presilha. A parte inferior do porta filtro é acoplada ao kitasato que, conectado à uma bomba de vácuo, recolhe o líquido filtrado. Antes do início das análises o porta filtro deve ser acoplado ao kitasato, embrulhado em papel kraft e esterilizado em autoclave (121°C/30min). Os copos de filtração devem ser embrulhados separadamente em papel kraft e também esterilizados em autoclave (121°C/30min). Alternativamente podem ser utilizados copos descartáveis estéreis, muito úteis quando o número de amostras para filtrar é alto. No momento do uso as duas partes devem ser desembrulhadas em uma câmara de fluxo laminar ou, na indisponibilidade desta, próximo à chama de um bico de Bunsen. O conjunto é preparado ajustando-se a membrana estéril no porta filtro (com a face quadriculada para cima) e o copo de filtração sobre a membrana. Conecta-se então o kitasato à

bomba de vácuo, para proceder à filtração. Podem também ser utilizados "manifolds", que têm vários porta filtros e permitem filtrar várias amostras simultaneamente.

> **Nota a1)** Entre uma amostra e outra, antes de posicionar uma nova membrana, o porta filtro deve ser flambado com álcool e o copo de filtração deve ser substituído. A cada 10 amostras recomenda-se filtrar no conjunto 100ml de um dos diluentes recomendados no Capítulo 2, estéril, incubando essa membrana para verificar possível contaminação cruzada entre as amostras. Após a filtração de 30 amostras o conjunto deve ser novamente esterilizado em autoclave, reiniciando uma nova série de filtrações. Se o intervalo entre uma filtração e outra for maior do que 30min e o conjunto estiver sendo utilizado fora da capela de fluxo laminar, então recomenda-se autoclavar todo o conjunto novamente, mesmo que não tenha sido atingido o limite de 30 amostras.

b) Preparação das placas. Na contagem pelo método de filtração em membrana, as placas mais comumente utilizadas são as de 50mm de diâmetro e 9mm de altura. Se for utilizado meio sólido, devem ser preparadas previamente, da mesma forma recomendada para o plaqueamento em superfície, distribuindo-se porções de 5ml do meio de cultura. Também é comum a prática de se utilizar o meio na forma de caldo, situação em que não é necessária a preparação prévia das placas. No momento da análise, deve-se colocar uma almofada absorvente ("pad") estéril no interior das placas também estéreis e embeber a almofada com porções de 2ml do mesmo meio, na forma líquida.

c) Homogeneização da amostra e retirada da unidade analítica. Homogeneizar a amostra seguindo os procedimentos descritos no Capítulo 2. Medir 100ml numa proveta estéril e verter cuidadosamente no copo do conjunto de filtração, evitando respingos. Se o copo do conjunto de filtração for graduado e a escala contiver a marcação de volume requerida, o volume da amostra pode ser medido diretamente, sem a utilização da proveta.

d) Diluição seriada da amostra. Como o método de filtração é uma técnica de concentração dos microrganismos em amostras com baixas contagens, geralmente não são feitas diluições seriadas da amostra. O procedimento usual é a filtração de 100ml, que podem ser fracionados em duas porções de 50ml, 4 porções de 25ml ou 3 porções de 70, 25 e 5ml, respectivamente. A seleção do volume a ser filtrado, entretanto, depende da contaminação estimada na amostra, de forma a resultar em placas com contagens na faixa de 20 a 200 colônias. Se for necessário o preparo de diluições, utilizar o mesmo procedimento descrito no Capítulo 2.

e) Filtração. Ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração. Após a passagem da amostra, ainda com a bomba ligada, enxaguar as paredes do copo com 20 a 30ml de um dos diluentes recomendados no Capítulo 2, para recolher eventuais contaminantes aderidos. Repetir esse procedimento mais uma vez. Desligar a bomba de vácuo antes que a membrana seque excessivamente. Quando o volume a ser filtrado for menor do que 20ml, adicionar ao copo do conjunto de filtração cerca de 20-30ml de diluente, antes da adição da amostra. Não é necessária uma medida exata do volume de diluente, cuja função é aumentar o volume a ser filtrado, facilitando uma melhor distribuição dos microrganismos na membrana.

f) Transferência e incubação da membrana. Retirar o copo e, com uma pinça flambada e resfriada, transferir a membrana para a placa com o meio de cultura, com a face quadriculada para cima. Ao colocar a membrana no meio de cultura é importante que toda a superfície fique completamente aderida ao meio, para que haja contato dos microrganismos com os nutrientes. Se houver formação de bolhas, deve-se levantar a borda da membrana mais próxima da(s) bolha(s)

e recolocá-la de forma a eliminar a(s) bolha(s). Incubar as placas nas condições recomendadas pelo ensaio (descrita nos capítulos específicos), invertidas e, preferencialmente, acondicionadas em sacos ou bandejas com papel toalha ou papel de filtro úmido, para evitar desidratação.

g) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Seguir as orientações do item 3.6.4.

3.6. CONTAGEM DAS COLÔNIAS E CÁLCULO DOS RESULTADOS

As instruções apresentadas nesse item são aplicáveis aos ensaios em que todas as colônias desenvolvidas nas placas, após o período de incubação, são contadas e consideradas no cálculo. No caso de ensaios que utilizam meios diferenciais, para distinguir o(s) microganismo(s) alvo da microbiota acompanhante (outros microganismos que podem crescer nas mesmas condições), apenas as colônias típicas são contadas e consideradas no cálculo. Esse é o caso da contagem de enterococos e enterobactérias, que seguem as orientações dos capítulos específicos. Da mesma forma, no caso dos ensaios que exigem a confirmação das colônias, apenas a porcentagem de colônias confirmadas é considerada no cálculo. Esse é o caso da contagem de bactérias lácticas, clostrídios sulfito redutores, *C. perfringens*, *S. aureus* e *B. cereus*, que também seguem as orientações dos capítulos específicos.

3.6.1. PLAQUEAMENTO EM PROFUNDIDADE

Para a contagem, selecionar as placas sem espalhamento, com número de colônias entre 25 e 250. Contar as colônias com o auxílio da lupa de um contador de colônias, para facilitar a visualização. Utilizar um contador de colônias que tenha o fundo quadriculado em cm^2, como guia para a contagem. Se não houver placas nessas condições ideais, seguir as orientações das regras 5 a 12, para a contagem.

> **Nota.** A ISO 7218:2007 considera aceitáveis placas com contagem entre 10 e 300 colônias, mas placas de duas diluições consecutivas, com número de colônias nessa faixa, são utilizadas no cálculo dos resultados (vide item 3.7)

Para calcular os resultados, há duas situações a considerar. A primeira é situação padrão, em que unidade analítica é uma massa ou volume da amostra, homogeneizada com o diluente. A segunda é a situação em que as amostras foram preparadas pelas técnicas do esfregaço de superfície ou da lavagem superficial.

Em todas as situações, usar notação exponencial na apresentação dos resultados, com apenas uma casa decimal depois da vírgula e aproximando para cima quando a segunda casa decimal for igual a cinco ou maior. A aproximação deve ser feita no número final obtido, depois de efetuados todos os cálculos.

3.6.1.1. Cálculo dos resultados na situação padrão

A situação padrão é aquela em que unidade analítica é uma massa ou volume da amostra, homogeneizada com o diluente. A regra geral para o cálculo dos resultados é: ***UFC/g ou ml = c/d.v***, sendo *c* o número de colônias na placa contada, *d* a diluição da placa contada e *v* o volume inoculado dessa diluição. Regras mais detalhadas para o cálculo dos resultados seguem abaixo.

> **Nota.** A regra geral para o cálculo dos resultados na ISO 7218:2007 é diferente (vide item 3.7).

Regra 1 - Se a contagem foi feita numa placa inoculada com a amostra sem diluição, sem duplicata, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) é igual ao número de colônias (Exemplos 1 e 2). Se foi feita duplicata, o número de UFC é igual à média aritmética da contagem obtida em cada uma das placas da duplicata (Exemplos 3 e 4).

Exemplo	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição			Contagem UFC/ml
	sem diluição (10^0)	10^{-1}	10^{-2}	
Sem duplicata				
1	199*	8	0	$199 = 2,0 \times 10^2$
2	245*	22	2	$245 = 2,5 \times 10^2$
Com duplicata				
3	62* - 57*	6 - 5	0 - 0	$(62 + 57)/2 = 59,5 = 6,0 \times 10^1$
4	123*- 136*	12 - 10	0 - 0	$(123 + 136)/2 = 129,5 = 1,3 \times 10^2$

* Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado.

Regra 2 - Se a contagem foi feita numa placa inoculada com a diluição 10^{-1} ou maior, sem duplicata, calcular o número de UFC/g ou ml multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada. O inverso da diluição 10^{-1} é 10^1, o inverso da 10^{-2} é 10^2 e assim por diante (Exemplos 5 e 6). Se foi feita duplicata, considerar como número de colônias a média aritmética da contagem obtida em cada uma das placas da duplicata e multiplicar pelo inverso da diluição (Exemplos 7 e 8).

Exemplo	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição			Contagem UFC/g ou ml
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
Sem duplicata				
5	199*	18	2	$199 \times 10^1 = 2,0 \times 10^3$
6	Inc	245*	22	$245 \times 10^2 = 2,5 \times 10^4$
Com duplicata				
7	Inc - Inc	62* - 57*	6 - 5	$[(62 + 57)/2] \times 10^2 = 59,5 \times 10^2 = 6,0 \times 10^3$
8	Inc - Inc	Inc - Inc	239*- 242*	$[(239 + 242/2] \times 10^3 = 135,5 \times 10^3 = 1,4 \times 10^5$

*Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado. Inc = Incontável

Regra 3 – Se o volume inoculado da primeira diluição (ou da amostra sem diluição) foi diferente de 1ml e a contagem foi feita na placa inoculada com esse volume, valem as regras anteriores mas o número de colônias deve ser dividido pelo volume inoculado, para calcular o resultado (Exemplos 9, 10, 11 e 12).

Exemplo	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição (volume inoculado)			Contagem UFC/g ou ml
	10^{-1} (2ml)	10^{-2} (1ml)	10^{-3} (1ml)	
Sem duplicata				
9	199*	18	2	$(199/2) \times 10^1 = 1,0 \times 10^3$
10	123*	2	0	$(123/2) \times 10^1 = 6,2 \times 10^2$
Com duplicata				
11	62* - 57*	6 - 5	0 - 0	$[(62 + 57)/2)]/2 \times 10^1 = 29,75 \times 10^1 = 3,0 \times 10^2$
12	27* - 35*	3 - 3	0 - 0	$[(27 + 35)/2)]/2 \times 10^1 = 15,5 \times 10^1 = 1,6 \times 10^2$

*Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado.

Regra 4 – Se a diluição inicial não foi decimal (1:20, 1:50, 1:200, etc.), valem as regras 2 e 3 mas é necessário inserir nos cálculos a diluição inicial aplicada. Considerando uma unidade analítica de ***m*** gramas ou mililitros, diluída em ***v*** mililitros de diluente, a diluição inicial é igual a ***m***/(***m***+***v***), ou seja, unidade analítica dividida pelo volume total (diluente + unidade analítica). As diluições decimais subseqüentes são a inicial multiplicada por 10^{-1} (1º decimal), a inicial multiplicada por 10^{-2} (2º decimal) e assim por diante. Por exemplo, para uma unidade analítica de 50g preparada com 950ml de diluente, a diluição inicial é de 50/(50+950) = 50/1.000 = 1/20 (1:20). A 1º decimal é $10^{-1}/20$, a 2º decimal é $10^{-2}/20$ e assim por diante. O cálculo dos resultados ainda é feito multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição mas, nesse caso, o inverso da diluição é a fração invertida: inverso da diluição 1/20 = 20/1, inverso da $10^{-1}/20$ = $20x10^1$, inverso da $10^{-2}/20$ = $20x10^2$ e assim por diante (Exemplos 13, 14, 15, 16, 17 e 18)

Exemplo	Unidade analítica	Volume diluente	Diluição inicial	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição			UFC/g ou ml amostra
				Inicial	1º decimal	2º decimal	
Sem duplicata							
13	10g	490ml	10/500 = 1/50	199*	18	2	199 x 50 = $1,0x10^4$
14	25g	350ml	25/375 = 1/15	280	30*	2	$30x15x10^1 = 4,5x10^3$
15	25	975ml	25/1.000 = 1/40	Inc	Inc	133*	$133x40x10^2 = 5,3x10^5$
Com duplicata							
16	25	475ml	25/500 = 1/20	237*-229*	21 - 20	2 - 1	[(237+229)/2] x 20 = $4,7x10^3$
17	10g	490ml	10/500 = 1/50	Inc - Inc	62* - 57*	6 - 5	[(62+57)/2] x $50x10^1 = 3,0x10^4$
18	10g	290ml	10/300 = 1/30	Inc - Inc	Inc - Inc	239*- 242*	[(239+242)/2] x $30x10^2 = 7,2x10^5$

*Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado. Inc = Incontável

Os exemplos acima são de cálculos em condições ideais, com número de colônias na faixa de 25 a 250, em placas da mesma diluição, sem espalhamento. Mas são bastante freqüentes as situações em que as placas não se apresentam em condições tão ideais, sendo aplicadas algumas regras básicas para o cálculo dos resultados. Essas regras são apresentadas a seguir, com exemplos no Quadro 3.1.

Regra 5 – Uma placa da duplicata com contagem acima ou abaixo da faixa de 25-250 colônias. Se a outra placa apresenta contagem na faixa de 25 a 250, considerar o número de colônias de ambas as placas no cálculo do resultado (Exemplo 30 do Quadro 3.1)

Regra 6 - Duas diluições consecutivas com 25-250 colônias. Calcular o número de UFC de cada diluição e comparar os resultados.

6.a. Se um dos resultados for maior do que o dobro do outro, considerar apenas o menor (Exemplos 19 e 31 do Quadro 3.1)

6.b. Se um dos resultados não ultrapassar o dobro do outro, então considerar ambos os resultados, apresentando a média como resultado final (Exemplos 20 e 32 do Quadro 3.1).

Regra 7 - Nenhuma placa atingiu 25 colônias. Contar as colônias nas placas com número mais próximo de 25, calcular o número de UFC (Exemplos 21 e 33 do Quadro 3.1) e apresentar o resultado como contagem estimada (est).

Regra 8 - Nenhuma placa com crescimento. Considerar o número de colônias na 1ª diluição inoculada como sendo um e calcular o resultado de acordo com as regras 1, 2, 3 ou 4 (Exemplos 22 e 34 do Quadro 3.1). Relatar o resultado final como menor do que o valor obtido no cálculo, valor estimado.

Se nenhuma placa houvesse apresentado crescimento nos exemplos 1 a 4 da Regra 1, o resultado final seria <1/ml (est). Nos exemplos 5 a 8 da regra 2 seria <10/g ou ml (est). Nos exemplos 9 a 12 da regra 3 seria <5/g ou ml (est). Nos exemplos 13 a 18 da regra 4 seria: <50, <15, <40, <20, <50 e <30 UFC/g ou ml, respectivamente.

Regra 9 - Todas as placas com mais de 250 colônias. Nestes casos há quatro alternativas para estimar o número de UFC/g ou ml. Em todos os casos, o resultado deve ser apresentado como contagem estimada (est).

9.a. Se for possível contar todas as colônias da placa, contar e calcular o número de UFC a partir da contagem obtida (Exemplos 23 e 35 do Quadro 3.1).

9.b. Se não for possível contar todas as colônias da placa, mas o número de colônias/cm^2 estiver abaixo de 10, contar as colônias em 12 quadrados de 1cm^2, 6 quadrados consecutivos na horizontal e 6 quadrados consecutivos na vertical, utilizando os quadrados demarcados no contador de colônias como guia. Calcular o número médio de colônias/cm^2 e, a partir da média, determinar o número total de colônias na placa, multiplicando a média pela área total da placa. Lembrar que a área total da placa é igual a $\boldsymbol{\pi d^2/4}$, onde **d** é o diâmetro interno. Por exemplo, placas de 100mm tem diâmetro interno por volta de 9cm e área total de aproximadamente 65cm^2. Utilizar este número total de colônias para calcular o número de UFC (Exemplo 24 do Quadro 3.1).

9.c. Se o número de colônias/cm^2 for maior do que 10, contar as colônias em quatro quadrados representativos da distribuição das colônias nas placas e calcular o número de UFC da mesma forma utilizada no caso de 12 quadrados (Exemplo 25 do Quadro 3.1).

9.d. Se o número de colônias/cm^2 for maior do que 100, apresentar o resultado como maior do que área total da placa x inverso da diluição (Exemplo 26 do Quadro 3.1).

Regra 10 – Número de colônias acima de 250 numa diluição e abaixo de 25 na seguinte. Se numa diluição o número de colônias ficou acima de 250 e na seguinte ficou abaixo, selecionar as placas com contagem mais próxima de 250 e calcular o número de UFC a partir da contagem obtida (Exemplos 27 e 36 do Quadro 3.1).

Regra 11 - Placas com espalhamento. Há dois tipos distintos de espalhamento. O primeiro é resultante da desintegração de agrupamentos de células, durante a mistura do inóculo com o meio de cultura. O segundo é resultante da inadequada mistura do inóculo com o meio, levando à formação de filmes de umidade na superfície do meio ou entre o meio e o fundo da placa. A distinção entre os dois tipos é facilmente visualizada, porque no espalhamento do primeiro tipo sempre se pode observar crescimento de colônias individuais, enquanto no outro, a massa de crescimento é contínua, não há ocorrência de colônias individuais. As placas com espalhamento poderão ser contadas nas seguintes condições: se nenhuma das zonas de espalhamento individuais tiver tamanho superior a 25% da área da placa e, ainda, se a área total coberta por zonas de espalhamento não ultrapassar 50% da placa. Em caso contrário, reportar o resultado como "acidente de laboratório" e repetir o ensaio. Se o laboratório observar ocorrência de espalhamento do segundo tipo, com tamanho superior a 25%, em mais de 5% das placas preparadas num período de trabalho, devem ser tomadas medidas preventivas para minimizar esse problema. Para contar placas com zonas de espalhamento do primeiro tipo, cada zona deve ser contada como uma única UFC, não contando as colônias individualmente dentro dessas zonas. Para contar placas com zonas de espalhamento do segundo tipo, selecionar uma região da placa, livre de espalhamento e contar as colônias em diversos quadrados de 1cm^2. Calcular a média de colônias/cm^2, multiplicar pela área

total da placa (65cm^2 no caso de placas com diâmetro externo de 100mm) e utilizar este valor estimado para calcular o número de UFC. Apresentar o resultado como contagem estimada (est) (Exemplos 28 e 37 do Quadro 3.1).

Regra 12 - Placas em que o crescimento é proporcionalmente maior nas maiores diluições. Esta situação pode ser decorrente da contaminação acidental da amostra durante o plaqueamento, de erro na identificação da diluição nas placas ou da presença de substâncias inibidoras na amostra. Considerar o resultado como "acidente de laboratório" e repetir o ensaio. Se a suspeita de presença de substâncias inibidoras na amostra for alta, utilizar na repetição um procedimento adequado para suprimir ou reduzir a influência desses componentes no resultado (vide anexo 2.2. do Capítulo 2) (Exemplo 29 do Quadro 3.1).

Quadro 3.1. Exemplos do cálculo dos resultados do plaqueamento em profundidade em condições não ideais.

Exemplo	Regras usadas	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição			Contagem UFC/g ou ml ***
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
Sem duplicata					
19	6.a	Inc	140*	32	140x10^2 = 1,4 x 10^4
20	6.b	Inc	243*	34*	[(243x10^2)+(34x10^3)]2 = 2,9 x 10^4
21	7	18*	2	0	18x10^1 = 1,8 x 10^2 est
22	8	0	0	0	< 1x10^1 = <10 est
23	9a	Inc	Inc	370*	370x10^3 = 3,7 x 10^5 est
24	9b	Inc	Inc	8/cm^2*	8x65x10^3 = 520x10^3 = 5,2 x 10^5 est
25	9c	Inc	Inc	21/cm^2*	21x65x10^3 = 1.365x10^3 = 1,4 x 10^6 est
26	9d	Inc	Inc	>100/cm^2*	> 100x65x10^3 = > 6,5 x 10^6 est
27	10, 9a	Inc	325*	20	325x10^2 = 3,3 x10^4 est
28	11	Inc	243* Esp	Esp	243x10^2 = 2,4 x10^4
29	12	27	215	20	Acidente de Laboratório
Com duplicata					
30	5	Inc - Inc	Inc - Inc	239*- 328*	[(239+328)/2]x10^3 = 283,5x10^3 = 2,8 x10^5
31	6a	138*- 162*	42 - 30	1 - 2	[(138+162)/2]x10^1 = 150x10^1 = 1,5 x10^3
32	6b	228*- 240*	28*- 26*	2 - 2	[(228+240)/2]x10^1 + [(28+26)/2]x10^2 = 2.520 = 2,5 x 10^3
33	7	18*- 16*	2 - 0	0 - 0	[(18+16)/2]x10^1 = 17x10^1 = 1,7 x 10^2
34	8	0 - 0	0 - 0	0 - 0	<10
35	9a	Inc - Inc	Inc - Inc	320*- 295*	[(320+295)/2]x10^3 = 307,5x10^3 = 3,1 x 10^5
36	10, 9a	287*- 263*	23 - 19	2 - 2	[(287+263)/2]x10^1 = 275x10^1 = 2,8 x 10^3
37	11, 6a	Inc - Inc	224*- 180*	28*-Esp	[(224+180)/2]x10^2 + 28x10^3 = 24.100 = 2,4 x 10^4

*Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado. Inc = Incontável, Esp = Espalhamento, Est = Estimada.

3.6.1.2. Cálculo dos resultados para amostras preparadas pela técnica do esfregaço de superfície ("swabs" ou esponjas)

Os resultados devem ser expressos em UFC por cm^2 de amostra. Inicialmente, deve-se calcular o número de UFC por mililitro do diluente onde foram recolhidos os "swabs". Para tanto, considerar essa suspensão como se fosse uma amostra sem diluição e, em função das diluições inoculadas dessa suspensão, calcular o resultado, da mesma forma descrita para o plaqueamento utilizado (profundidade, superfície, gotas ou filtração em membrana).

Em seguida, deve-se converter a contagem de UFC/ml da suspensão para UFC/cm^2 da amostra. Para tanto, calcular a quantos cm^2 corresponde cada mililitro da suspensão. No procedimento padrão descrito no Capítulo 2 para amostragem com "swabs, que amostra uma área de 50cm^2 e recolhe os "swabs"em 10ml de diluente, cada mililitro de diluente corresponde a 5cm^2 de superfície. Essa relação, entretanto, pode ser alterada a critério do laboratório, dependendo do

tipo de amostra e objetivo da amostragem. É recomendável trabalhar sempre com volumes de diluente múltiplos das áreas amostradas, para facilitar os cálculos. No caso acima, a contagem em UFC/cm^2 será igual ao valor obtido por ml de suspensão, dividido por cinco. No procedimento descrito no Capítulo 2 para amostragem com esponjas, que amostra 100cm^2 e recolhe as esponjas em 25ml de diluente, cada mililitro de diluente corresponde a 4cm^2 de superfície. Nesse caso, a contagem em UFC/cm^2 será igual ao valor obtido por ml de suspensão, dividido por quatro. Numa outra situação, em que um esfregaço de 100cm^2 de área fosse suspendido em 10ml de diluente, por exemplo, cada ml de suspensão corresponderia a 10cm^2 de área e o número de UFC/cm^2 seria igual ao valor obtido por ml de suspensão, dividido por dez.

$$\text{UFC/cm}^2 = \text{UFC/ml da suspensão} \times \frac{\text{Área amostrada}}{\text{Volume de diluente de coleta}}$$

3.6.1.3. Cálculo dos resultados para amostras preparadas pela técnica da lavagem superficial

No caso de alimentos, os resultados devem ser expressos em UFC/g de amostra. Inicialmente, deve-se calcular o número de UFC por mililitro do diluente de lavagem. Para tanto, considerar essa suspensão de lavagem como se fosse uma amostra sem diluição e, em função das diluições inoculadas dessa suspensão, calcular o resultado da mesma forma descrita para o plaqueamento utilizado (profundidade, superfície, gotas ou filtração em membrana).

Em seguida, deve-se converter o número de UFC/ml da suspensão de lavagem para UFC/g de amostra, em função da diluição inicial utilizada na lavagem (peso de amostra: volume de diluente). Se a diluição foi 1:1, cada ml de lavado corresponderá a 1g de amostra e o número de UFC/g será igual ao valor obtido por ml. Se a diluição for diferente de 1:1, deve-se primeiro calcular a quantos gramas de amostra corresponde 1ml de lavado, que é igual ao peso da amostra lavada dividido pelo volume de diluente usado. Por exemplo, se uma carcaça de frango de 1,6kg for lavada com 400ml de diluente, cada ml de lavado corresponderá a 4g de amostra. Neste caso, o número de UFC/g de amostra será igual ao número de UFC/ml de lavado, dividido por quatro.

$$\text{UFC/g} = \text{UFC/ml da suspensão} \times \frac{\text{Volume de diluente usado na lavagem}}{\text{Peso de amostra lavada}}$$

No caso de embalagens, os resultados podem ser expressos em UFC/cm^3 da embalagem ou em UFC por embalagem. Inicialmente, deve-se calcular o número de UFC por mililitro de água de lavagem, da mesma forma indicada para a análise de alimentos.

Em seguida, deve-se converter o número de UFC/ml de água de lavagem para UFC/cm^3, em função do volume de diluente usado na lavagem. Para isso, deve-se primeiro calcular a quantos cm^3 da embalagem corresponde 1ml de lavado. Esse valor é igual à capacidade da embalagem dividida pelo volume de diluente usado, ou seja se uma embalagem de 500ml foi lavada com 100ml de diluente, cada mililitro de lavado corresponderá a 5cm^3. Neste caso, o número de UFC/cm^3 será igual ao número de UFC/ml de lavado dividido por cinco.

$$\text{UFC/cm}^3 = \text{UFC/ml da suspensão} \times \frac{\text{Volume de diluente usado na lavagem}}{\text{Capacidade da embalagem}}$$

Para determinar o número de UFC por embalagem, basta multiplicar o número de UFC/cm^3 pela capacidade da embalagem.

UFC/embalagem = UFC/cm^3 x Capacidade da embalagem

3.6.2. PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE

Assim como no plaqueamento em profundidade, as recomendações apresentadas nesse item são aplicáveis aos ensaios em que todas as colônias desenvolvidas nas placas, após o período de incubação, são contadas e consideradas no cálculo.

A contagem das colônias e o cálculo dos resultados são feitos da mesma forma descrita para o plaqueamento em profundidade, seguindo as mesmas regras. Entretanto, o resultado final deve ser multiplicado por 10 (dez), para levar em conta o volume 10 vezes menor inoculado. Se foi feita a distribuição de 1ml da primeira diluição em várias placas, o número de colônias dessa diluição é a soma de todas as placas. Se o cálculo do resultado for feito com a contagem dessa diluição, então não é necessário multiplicar por 10.

3.6.3. PLAQUEAMENTO EM GOTAS

Assim como no plaqueamento em profundidade, as recomendações apresentadas nesse item são aplicáveis aos ensaios em que todas as colônias desenvolvidas nas placas, após o período de incubação, são contadas e consideradas no cálculo.

Contar as colônias das gotas com no máximo 30 colônias. Para calcular o número de UFC/g ou ml, tirar a média do número de colônias nas três gotas da diluição inoculada, multiplicar pelo inverso da diluição e em seguida por 100, para considerar o volume inoculado (UFC/g ou ml = Nº Colônias X 100/diluição).

3.6.4. FILTRAÇÃO EM MEMBRANA

Assim como no plaqueamento em profundidade, as recomendações apresentadas nesse item são aplicáveis aos ensaios em que todas as colônias desenvolvidas nas placas, após o período de incubação, são contadas e consideradas no cálculo.

Proceder à contagem das colônias com o auxílio de um microscópio estereoscópico, com aumento de 10 a 15 vezes e, para facilitar a visualização posicionar as placas de forma a obter uma iluminação perpendicular ao plano da membrana. Selecionar para contagem placas com 20 a 200 colônias. Seguir as regras abaixo para contagem e cálculo do número de UFC/ml:

Regra 1. Se o número de colônias por quadrícula da membrana for menor ou igual a 2, contar todas as colônias presentes e dividir pelo volume filtrado, para obter o número de UFC/ml.

Regra 2. Se o número de colônias por quadrícula estiver na faixa de 3 a 10, contar 10 quadrículas e tirar a média por quadrícula. Multiplicar esse valor por 100 e dividir pelo volume filtrado, para obter o número de UFC/ml. Se o número de colônias por quadrícula estiver na faixa de 10 a 20, contar apenas 5 quadrículas para tirar a média e calcular o número de UFC/ml da mesma forma.

Regra 3. Se o número de colônias por quadrícula for maior do que 20, expressar o resultado como maior do que 2000 dividido pelo volume filtrado.

Regra 4. Se foi feita a filtração de uma solução obtida de amostra sólida (sal ou açúcar, por exemplo), valem as regras 1, 2 e 3 mas o valor deve ser convertido para UFC/g em função quantidade de amostra na solução. Exemplo: Dissolvidas 25g de açúcar em 225ml de água peptonada 0,1% (diluição 1:10), filtrados 100ml da solução e contadas 120 colônias na membrana. Cada mililitro da solução eqüivale a 0,1g de amostras, portanto, em 100ml foi filtrada uma quantidade equivalente a 10g da amostra sólida. Então:

UFC/100ml de solução = UFC/10g de amostra = 120 ⇒ UFC/g = 120/10 = 12

3.7. CONTAGEM DAS COLÔNIAS E CÁLCULO DOS RESULTADOS SEGUNDO A ISO 7218:2007

O cálculo dos resultados da contagem em placas nos métodos ISO é um pouco diferente do apresentado no item 3.6. A ISO 7218:2007 considera placas com número de colônias entre 10 e 300, de duas diluições sucessivas, no cálculo dos resultados. A quantidade da amostra inoculada nas placas das duas diluições também é considerada nos cálculos. As regras seguem abaixo.

> **Nota.** Na contagem de microrganismos específicos, em que são consideradas apenas as colônias confirmadas, as regras variam com cada norma, devendo ser consultados os capítulos específicos (Vide Capítulo 18 para *Listeria monocytogenes* e 24 para *Pseudomonas* spp).

Regra 1 - Geral. A regra geral para o cálculo dos resultados é: o número de UFC/g ou ml é igual à soma das colônias presentes em cada placa selecionada para a contagem, dividido pela soma da quantidade de amostra inoculada em cada uma dessas placas (Exemplos 1 a 14):

Exemplo	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição			Soma da quantidade de amostra inoculada nas placas selecionadas	UFC/g ou ml
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
Sem duplicata, plaqueamento em profundidade (1ml/diluição)					
1	245*	22*	2	$1x10^{-1}+1x10^{-2}=0,11$	(245+22)/0,11 = 2.427,27 = $2,4x10^3$
2	297*	31*	3	$1x10^{-1}+1x10^{-2}=0,11$	(297+31)/0,011 = 2.981,81 = $3,0x10^3$
3	Inc	168*	14*	$1x10^{-2}+1x10^{-3}=0,011$	(168+14)/0,011 = 16.545,45 = $1,7x10^4$
4	Inc	272*	22*	$1x10^{-2}+1x10^{-3}=0,011$	(272+22)/0,011 = 26.727,27 = $2,7x10^4$
5	Inc	Inc	126*	$1x10^{-3}=0,001$	126/0,001 = 126.000 = $1,3x10^5$
Sem duplicata, plaqueamento em superfície (0,1ml/diluição)					
6	245*	22*	2	$0,1x10^{-1}+0,1x10^{-2}=0,011$	(245+22)/0,011 = 24.272,72 = $2,4x10^4$
7	297*	31*	3	$0,1x10^{-1}+0,1x10^{-2}=0,011$	(297+31)/0,011 = 29.818,18 = $3,0x10^4$
8	Inc	168*	14*	$0,1x10^{-2}+0,1x10^{-3}=0,0011$	(168+14)/0,0011 = 165.454,54 = $1,7x10^5$
9	Inc	272*	22*	$0,1x10^{-2}+0,1x10^{-3}=0,0011$	(272+22)/0,0011 = 267.272,72 = $2,7x10^5$
10	Inc	Inc	126*	$0,1x10^{-3}=0,0001$	126/0,0001 = 1.260.000 = $1,3x10^6$
Com duplicata, plaqueamento em profundidade (1ml/diluição)					
11	123*- 136*	12* - 10*	0 - 0	$2x10^{-1}+2x10^{-2}=0,22$	(123+136+12+10)/0,22 = 1.277,27 = $1,3x10^3$
12	Inc - Inc	266* - 289*	22* - 27*	$2x10^{-2}+2x10^{-3}=0,022$	(266+289+22+27)/0,022 = 18.363,63 = $1,8x10^4$
Com duplicata, plaqueamento em superfície (0,1ml/diluição)					
13	123*- 136*	12* - 10*	0 - 0	$2x0,1x10^{-1}+2x0,1x10^{-2}=0,022$	(123+136+12+10)/0,022 = 12.772,72 = $1,3x10^4$
14	Inc - Inc	266* - 289*	22* - 27*	$2x0,1x10^{-2}+2x0,1x10^{-3}=0,0022$	(266+289+22+27)/0,0022 = 183.636,36 = $1,8x10^5$

*Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado, Inc = Incontável, est = contagem estimada.

Regra 2 - Nenhuma placa atingiu 10 colônias. Se nenhuma placa apresentou número de colônias maior ou igual a dez, calcular os resultados conforme abaixo:

2.a) Se o número de colônias for maior ou igual a quatro, calcular o resultado como na regra 1, mas relatar como "contagem estimada" (Exemplos15, 16, 19, 20)

2.b) Se o número de colônias não chegou a quatro em nenhuma placa, calcular o resultado de quatro colônias e relatar como "presente (menor do que o valor obtido)" (Exemplos 17, 21).

2.c) Se nenhuma placa apresentou crescimento, calcular o resultado de uma colônia e relatar como "menor do que o valor obtido" (Exemplos 18, 22).

Exemplo	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição			Soma da quantidade de amostra inoculada nas placas selecionadas	UFC/g ou ml
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
Sem duplicata, plaqueamento em profundidade (1ml/diluição)					
15	8*	0	0	1x10^{-1}=0,1	8/0,1 = 80 (est)
16	4*	0	0	1x10^{-1}=0,1	4/0,1 = 40 (est)
17	3	0	0	1x10^{-1}=0,1	presente (<40)
18	0	0	0	1x10^{-1}=0,1	<1/0,1 = <10
Sem duplicata, plaqueamento em superfície (0,1ml/diluição)					
19	8*	0	0	0,1x10^{-1}=0,01	8/0,01 = 800 = 8,0x10^{2} (est)
20	4*	0	0	0,1x10^{-1}=0,01	4/0,01 = 400 = 4,0x10^{2} (est)
21	3	0	0	0,1x10^{-1}=0,01	presente (<4,0x10^{2})
22	0	0	0	0,1x10^{-1}=0,01	<1/0,01 = <100 = <10^{2}

*Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado, Inc = Incontável, est = contagem estimada.

Regra 3 - Número de colônias acima de 300 numa diluição e abaixo de 10 na seguinte. Se numa diluição o número de colônias ficou acima de 300 e na seguinte ficou abaixo de 10, calcular os resultados conforme abaixo:

3.a) Se o número de colônias nas placas não for maior do que 334 (limite superior do intervalo de confiança) ou menor do que oito (limite inferior do intervalo de confiança), calcular o resultado como na regra 1, usando as placas das duas diluições nos cálculos (Exemplo 23)

3.b) Se uma placa apresentou menos de 334 colônias, mas na da diluição subseqüente o número foi menor do que oito, considerar apenas o maior valor nos cálculos (Exemplo 24)

3.c) Se uma placa apresentou mais de 334 colônias, mas na da diluição subseqüente o número não foi menor do que oito, considerar apenas o menor valor nos cálculos (Exemplo 25).

3.d) Se uma placa apresentou mais de 334 colônias e na da diluição subseqüente o número foi menor do que oito, repetir o ensaio, porque esse resultado é inaceitável (Exemplo 26).

3.e) Há ensaios em que o faixa de contagem recomendada é de 10 a 150. Nesses casos limite superior do intervalo de confiança é 167 colônias e o inferior é sete, valendo as regras 3a, 3b, 3c e 3d, ajustadas a esses limites.

Exemplo	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição			Soma da quantidade de amostra inoculada nas placas selecionadas	UFC/g ou ml
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
Sem duplicata, plaqueamento em profundidade (1ml/diluição)					
23	310*	8*	0	1x10^{-1}+1x10^{-2}=0,11	(310+8)/0,11 = 2.890,90 = 2,9x10^{3}
24	308*	<8	0	1x10^{-1}=0,1	308/0,1 = 3.080 = 3,1x10^{3}
25	>334	9*	0	1x10^{-2}=0,01	9/0,01 = 900 = 9,0x10^{2}
26	>334	<8	0	-	resultado inaceitável - repetir o ensaio

*Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado, Inc = Incontável, est = contagem estimada.

Regra 4 - Todas as placas com mais de 300 colônias. Nestes casos, calcular o resultado de 300 colônias e relatar como "maior do que o valor obtido" (Exemplos 27, 28).

Exemplo	Nº colônias na(s) placa(s) da diluição			Soma da quantidade de amostra inoculada nas placas selecionadas	UFC/g ou ml
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
Sem duplicata, plaqueamento em profundidade (1ml/diluição)					
27	Inc	Inc	303	$1x10^{-3}$=0,001	>300/0,001 = >300.000 = >$3,0x10^{5}$
28	Inc	Inc	Inc	$1x10^{-3}$=0,001	>300/0,001 = >300.000 = >$3,0x10^{5}$

*Contagens efetivamente utilizadas no cálculo do resultado, Inc = Incontável, est = contagem estimada.

3.8. REFERÊNCIAS

ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: *General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions, 1st ed.* The International Organization for Standardization, 1999.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - *General requirements and guidance for microbiological examination, 3rd ed.* The International Organization for Standardization, 2007.

SWANSON, K.M.J, PETRAN, R.L. & HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 6, p.53-67.

Capítulo 4

Técnicas Básicas de Contagem de Microrganismos pelo Número Mais Provável (NMP)

4.1. INTRODUÇÃO

A maioria das orientações contidas nesse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (Swanson *et al.*, 2001). Quando diferentes ou complementares às do *Compendium,* foram também incluídas orientações do *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online* (Blodgett, 2006) e da norma ISO 6887-1 (1999), recomendada para ensaios realizados com metodologia da International Organization for Standardization.

A técnica do número mais provável é um método de análise quantitativo que permite determinar o número mais provável (NMP) do(s) microrganismo(s) alvo na amostra, através da inoculação de alíquotas dessa amostra em uma série de tubos, contendo um meio de cultura líquido adequado ao seu crescimento. A determinação do número de microrganismos é baseada no princípio de que, subdividindo a amostra em alíquotas, algumas alíquotas vão conter microrganismos e outras não, dependendo da quantidade dos microrganismos na amostra. O número de alíquotas com microrganismos (tubos com crescimento positivo após a incubação) e alíquotas sem microrganismos (tubos com crescimento negativo após a incubação) permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra. Essa aplicação da teoria da probabilidade depende de que os microrganismos estejam distribuídos ao acaso e homogeneamente por toda a amostra. No caso de amostras líquidas, essa condição pode ser atingida sem dificuldade, através da cuidadosa agitação do material. No caso de amostras sólidas, pode ser atingida no preparo e homogeneização da primeira diluição, tomando-se as alíquotas a partir dessa diluição. Há situações em que as alíquotas da amostra sólida são inoculadas diretamente no caldo de cultura. A inoculação direta das amostras sólidas, entretanto, é menos comum e depende do tipo de amostra.

Como a inoculação é feita em meios líquidos, a técnica do NMP apresenta algumas vantagens em relação à contagem padrão em placas. Uma delas é a possibilidade de inocular quantidades maiores da amostra, aumentando-se proporcionalmente o volume de meio de cultura. Isso confere á técnica uma sensibilidade maior do que a da contagem em placas e uma grande flexibilidade no estabelecimento do limite de detecção. Outra vantagem é que permite a introdução de etapas de recuperação de injúrias, utilizando um meio não seletivo para a inoculação inicial, mais favorável aos microrganismos injuriados, e depois transferindo a cultura para meios seletivos.

A técnica do NMP é bastante versátil, permitindo a enumeração de diferentes grupos ou espécies de microrganismos, variando-se o meio de cultura e as condições de incubação. Suas principais aplicações são a contagem de coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli* em água e alimentos. Pode também ser utilizada em outros ensaios quantitativos, quando a contaminação esperada na amostra está abaixo do limite de detecção do plaqueamento ou quando partículas do alimento interferem na contagem em placas. Uma outra aplicação é a adaptação de métodos qualitativos para quantitativos, como a contagem de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e outros microrganismos tradicionalmente analisados por métodos de presença/ausência.

Para a homogeneização da amostra e preparo das diluições, são utilizados os procedimentos descritos no Capítulo 2. Para a inoculação, a técnica do NMP apresenta dois formatos, dependendo de como as alíquotas são distribuídas. Um é o formato do teste de diluição múltipla, no qual três, cinco ou dez alíquotas de uma diluição são inoculadas numa série de três, cinco ou dez tubos e, depois, uma nova série de três, cinco ou dez alíquotas, da diluição subseqüente, são inoculadas em outra série de tubos e assim por diante. Quanto maior o número de diluições e de tubos por diluição, maior a precisão da contagem. Para a maioria das situações encontradas na análise de alimentos, três diluições com três tubos por diluição são suficientes para uma boa estimativa do NMP. O outro formato é o do teste de diluição única, no qual todas as alíquotas inoculadas (geralmente cinco a dez) são de uma mesma diluição, com igual quantidade da amostra.

4.2. TESTE DE DILUIÇÃO MÚLTIPLA

O teste de diluição múltipla é o mais versátil dos formatos da técnica do NMP, porque permite abranger uma faixa ampla de concentrações dos microrganismos na amostra, variando-se as diluições inoculadas. O procedimento padrão é a inoculação de três diluições decimais seqüenciais da amostra, três alíquotas por diluição ou, mais raramente, cinco alíquotas por diluição e/ou cinco diluições. A técnica, entretanto, permite procedimentos não tão comuns, como a inoculação de um número maior de diluições decimais, um número maior de alíquotas por diluição ou, mesmo, diluições não decimais. Nesses casos o procedimento analítico é o mesmo, mas varia a forma de cálculo dos resultados. O procedimento padrão apresenta a vantagem de ter os resultados tabelados em Tabelas de NMP, enquanto os não padrão requerem o uso de fórmulas para o cálculo.

A seleção das diluições depende da contaminação estimada da amostra, de forma a obter tubos positivos nas menores diluições (maiores alíquotas da amostra) e tubos negativos nas maiores diluições (menores alíquotas da amostra). Para orientação, as diluições recomendadas para amostras com contaminação na faixa de 3 a 1.000/g ou ml, são a 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}. Se a contaminação esperada estiver acima dessa faixa, deve-se inocular diluições mais altas. Caso não seja possível estimar previamente o nível de contaminação da amostra, deve-se inocular mais do que três diluições (pelo menos cinco), partindo-se da diluição inicial. Se a contaminação estimada estiver abaixo dessa faixa, pode-se inocular volumes maiores da amostra sem diluição (no caso de líquidos) ou da primeira diluição (no caso de sólidos), aumentando proporcionalmente o volume de meio de cultura. A proporção entre o volume inoculado e o volume de meio de cultura recomendado pelo *Compendium* (Swanson *et al.*, 2001) é: uma parte da amostra ou diluição adicionada a dez partes do caldo. Uma prática bastante comum, que mantém essa proporção, é a inoculação de 10ml das amostras líquidas, sem diluição, em 10ml do meio de cultura em concentração dupla. Essa prática também é muito utilizada na inoculação da primeira diluição de amostras sólidas. Para orientação na seleção das diluições pode ser consultado o Quadro 4.1, que apresenta a

quantidade de amostra presente nas alíquotas de várias combinações de diluições, com o limite de detecção da técnica em cada combinação. Outras combinações são possíveis, particularmente no caso de amostras líquidas, que podem ser adicionadas diretamente no caldo, como a combinação decimal 100 – 10 – 1ml ou a não decimal 500 – 50 –5, por exemplo. No caso de amostras sólidas as opções são mais restritas, porque, como já mencionado anteriormente, nem todos os produtos apresentam distribuição de microrganismos homogênea para inoculação direta. Nos casos em que isso ocorre, podem ser utilizadas as mesmas combinações dos produtos líquidos.

A seleção do meio de cultura mais adequado para a inoculação das alíquotas varia para cada ensaio, em função do(s) microrganismo(s) alvo, sendo descrita nos capítulos específicos.

A verificação da presença do(s) microrganismo(s) alvo nas alíquotas inoculadas após a incubação, para cálculo do NMP, também varia para cada ensaio, sendo descrita nos capítulos específicos. Na maioria dos ensaios essa verificação inclui não só a ocorrência de crescimento, mas também o desenvolvimento ou não de características típicas do(s) microrganismo(s) alvo no meio utilizado. Além disso, a maioria dos ensaios exige ainda uma ou mais etapas de confirmação, que é feita transferindo-se a cultura obtida no primeiro meio inoculado, para outros meios de confirmação. Por exemplo, em um dos métodos de ensaio de coliformes totais, as alíquotas são inoculadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubadas a 35°C/24h e verificada a ocorrência ou não de crescimento com produção de gás. As culturas obtidas nos tubos positivos para essas duas características são transferidas para o caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB), que é um meio seletivo para coliformes totais. Após a incubação a 35°C/24h, é novamente verificada a ocorrência ou não de crescimento com produção de gás. Apenas as culturas positivas para essas duas características, em VB, são confirmadas como coliformes totais. O caldo LST permite o crescimento de uma série de outros microrganismos produtores de gás que, no Caldo VB, são inibidos ou diferenciados dos coliformes totais. A inoculação não é feita diretamente em VB porque a presença de agentes seletivos pode inibir os coliformes injuriados. A etapa inicial no LST garante a recuperação das injúrias, permitindo o crescimento posterior em condições seletivas.

4.2.1. MATERIAL REQUERIDO NAS ANÁLISES

- Material para preparação da amostra e diluições seriadas, descritos no Capítulo 2
- Meios de cultura recomendados para o ensaio a ser realizado, descritos nos capítulos específicos
- Estufa(s) incubadora ou banho(s) maria regulado(s) na(s) temperatura(s) especificada(s) pelo ensaio a ser realizado, descrita(s) nos capítulos específicos

4.2.2. PROCEDIMENTO

Antes de iniciar o procedimento, observar os cuidados descritos no Capítulo 2, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas. Identificar todos os tubos que serão inoculados, com o código da amostra, a diluição e a sigla do meio de cultura contido.

a) Preparação das amostras e diluições. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Seguindo as orientações apresentadas acima, selecionar três ou mais diluições decimais seqüenciais da amostra para a inoculação. Inocular três alíquotas de cada diluição em tubos do caldo de cultura, selecionando o caldo de acordo com o ensaio a ser realizado (nos capítulos específicos). Em alguns ensaios recomenda-se utilizar uma série de cinco alíquotas por diluição, sendo essa recomendação também mencionada nos capítulos específicos.Utilizar uma pipeta diferente para cada diluição, com capacidade não maior do que 10ml. A incerteza da medição dos volumes não deve exceder 5% (ISO 6887-1, 1999). Observar criteriosamente se os tubos

utilizados correspondem à amostra e à diluição que estão sendo inoculadas. Mudar os tubos de posição, à medida que sejam inoculadas, para não inocular o mesmo tubo mais de uma vez ou deixar algum tubo sem inocular.

c) Incubação. Incubar os tubos nas condições especificadas para o ensaio, nos capítulos específicos.

d) Verificação da presença do(s) microrganismo(s) alvo nos tubos. A definição das características a serem consideradas como indicação da presença do(s) microrganismo(s) alvo nos tubos são definidas nos capítulos específicos. Essas características podem ser:

d.1) Crescimento. O crescimento é verificado pela turvação do meio de cultura, desde que não provocada pela própria amostra. Nesse segundo caso, pode ser necessário um procedimento alternativo para confirmar o crescimento. Um dos mais usados é transferir uma alçada do caldo suspeito para um novo tubo do mesmo meio e verificar a turvação, confirmativa do crescimento no primeiro.

d.2) Produção de gás. A produção de gás pode ser verificada pela formação de bolhas em tubos invertidos (tubos de Durhan), colocados nos tubos de caldo antes da esterilização. Na utilização dessa técnica é importante verificar, previamente, se não houve formação de pequenas bolhas nos tubos de Durhan, durante a estocagem do meio em geladeira. Essas bolhas são provocadas pelo ar dissolvido no líquido e, se presentes, o tubo deve ser descartado e substituído por outro. Outra alternativa utilizada para verificar a produção de gás é cobrir a superfície do caldo com vaspar ou ágar selo, depois da inoculação, verificando seu deslocamento para cima, quando há formação de gás.

d.3) Produção de ácido ou base. A produção de ácido ou base pode ser verificada pela viragem de um indicador de pH adicionado ao caldo de cultura (púrpura de bromocresol, vermelho de fenol e outros). Outra alternativa usada é medir o pH ou a acidez titulável do meio depois da incubação.

d.4) Alteração do potencial redox. A alteração do potencial de óxido redução é verificada pela viragem de aceptores de elétrons como a rezarzurina, o azul de metileno e o cloreto de trifeniltetrazólio.

e) Transferências. A maioria dos ensaios que utilizam a técnica do NMP exige a transferência da cultura obtida nos tubos inoculados, para confirmação da presença do(s) microrganismo(s) alvo. Apenas os tubos contendo culturas confirmadas são considerados como positivos no cálculo do NMP. As transferências requeridas em cada ensaio encontram-se descritas nos capítulos específicos.

4.3. TESTE DE DILUIÇÃO ÚNICA

O teste de diluição única é mais utilizado para amostras com baixo nível de contaminação, para as quais não há necessidade nem se justifica a preparação de diluições. Uma de suas principais aplicações são a contagem de coliformes em água tratada e em sucos e refrigerantes.

O procedimento padrão é a inoculação de cinco ou dez alíquotas de 10ml das amostras líquidas em 10ml do caldo de cultura em concentração dupla (50 a 100ml no total), ou cinco ou dez alíquotas de 10 ml da primeira diluição das amostras sólidas, em 10ml do caldo em concentração dupla (5 a 10g no total). Essas quantidades podem variar dependendo da contaminação esperada na amostra, podendo ser inoculadas cinco ou dez porções de 100ml em 100ml de caldo em

concentração dupla, para amostras com nível mais baixo de contaminação, ou cinco ou dez porções de 1ml em 10ml de caldo em concentração simples, para amostras com nível mais alto de contaminação. A inoculação de cinco ou dez alíquotas com quantidades múltiplas de dez apresentam a vantagem de ter os resultados tabelados em Tabelas de NMP. Pode, entretanto, ser inoculado qualquer número de alíquotas, de qualquer quantidade, desde que todas sejam iguais e que a diluição seja de uma parte da amostra adicionada em dez partes de caldo. Nesses casos, o cálculo dos resultados utiliza fórmulas, em vez das tabelas.

Assim como no teste de diluição múltipla, a seleção do meio de cultura e a forma de verificação da presença do(s) microrganismo(s) alvo nas alíquotas inoculadas encontra-se descrita nos capítulos específicos. Dependendo da complexidade dos testes de confirmação subseqüentes, o formato de cinco alíquotas pode ser mais vantajoso para amostras com baixa contaminação, do que o de dez alíquotas ou o teste de diluição múltipla.

4.3.1. MATERIAL REQUERIDO NAS ANÁLISES

- Material para preparação da amostra, descritos no Capítulo 2
- Meios de cultura recomendados para o ensaio a ser realizado, descritos nos capítulos específicos
- Estufa(s) incubadora ou banho(s) maria regulado(s) na(s) temperatura(s) especificada(s)pelo ensaio a ser realizado, descrita(s) nos capítulos específicos

4.3.2. PROCEDIMENTO

Antes de iniciar o procedimento, observar os cuidados descritos no Capítulo 2, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas. Identificar todos os tubos que serão inoculados, com o código da amostra e a sigla do meio de cultura contido.

a) Preparação das amostras. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Seguindo as orientações apresentadas acima, selecionar as quantidades mais adequadas da amostra para a inoculação. Inocular cinco ou dez alíquotas da amostra em cinco a dez tubos ou frascos do caldo de cultura, adicionando uma parte da alíquota para dez partes do caldo. Selecionar o caldo de acordo com o ensaio a ser realizado (nos capítulos específicos). A incerteza da medição dos volumes não deve exceder 5% (ISO 6887-1, 1999). Mudar os tubos ou frascos de posição, à medida que sejam inoculadas, para não inocular o mesmo tubo/frasco mais de uma vez ou deixar algum tubo/frasco sem inocular.

c) Incubação. Incubar os tubos nas condições especificadas para o ensaio, descritas nos capítulos específicos.

d) Verificação da presença do(s) microrganismo(s) alvo nos tubos. Seguir as mesmas orientações do teste de diluição múltipla.

e) Transferências. Seguir as mesmas orientações do teste de diluição múltipla.

4.4. CÁLCULO DOS RESULTADOS

A combinação de tubos positivos e negativos na técnica do NMP permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade do(s) microrganismo(s) alvo na amostra. Os cálculos podem ser

feitos usando várias fórmulas, mas, para as para as combinações de tubos positivos e negativos que ocorrem com maior freqüência, os valores já foram calculados e tabulados em tabelas de NMP, não sendo necessário o uso de fórmulas. As combinações que ocorrem com menor freqüência são omitidas na tabulação e, nesses casos, o cálculo do resultado pode ser feito através das fórmulas, mas é recomendável repetir antes o ensaio, para confirmar a ocorrência da combinação.

4.4.1. CÁLCULO DOS RESULTADOS DO TESTE DE DILUIÇÃO MÚLTIPLA

4.4.1.1. Cálculo usando as tabelas de NMP (para diluições decimais)

A Tabela NMP-1 do Anexo 4.1, retirada do *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006), apresenta os resultados de uma série de três tubos inoculados com alíquotas de 0,1 – 0,01 e 0,001g ou ml da amostra. A Tabela NMP-2 do Anexo 4.1, retirada da mesma fonte, apresenta os resultados de uma série de cinco tubos inoculados com as mesmas alíquotas. Para outras alíquotas, são usadas as mesmas tabelas, com um fator de conversão para multiplicar ou dividir o valor lido, em função do tamanho das alíquotas inoculadas. Observar que as diluições são decimais e que as tabelas utilizam a quantidade da amostra nas alíquotas, não a diluição inoculada. Assim, para facilitar o uso, o Quadro 4.1 apresenta a correspondência entre diluições inoculadas e quantidade de amostra nas alíquotas, bem como o fator de conversão do resultado quando as alíquotas são diferentes das tabeladas. Além da estimativa do NMP/g ou ml da amostra, as tabelas de NMP também apresentam, para cada combinação de tubos positivos e negativos, o limite superior e o limite inferior da estimativa do NMP, ao nível de 95% de confiança. Esse é intervalo em que se encontra a contagem verdadeira (mas desconhecida) dos microrganismos na amostra, em 95% das vezes.

Quadro 4.1. Orientação para o uso das tabelas de NMP, em função da quantidade de amostra presente nas alíquotas e das diluições inoculadas, com o limite de detecção da contagem e a regra para conversão do resultado.

Combinação de diluições*		Quantidade de amostra nas alíquotas (g ou ml)	Limite de detecção (por g ou ml da amostra)	Fator de conversão do resultado na Tabela
1	S/D (100ml) - S/D (10ml) - SD (1ml)	100 – 10 – 1	0,003	dividir por 1.000
2	S/D (10ml) - S/D (1ml) - 10^{-1} (1ml)	10 – 1 – 0,1	0,03	dividir por 100
3	S/D (1ml) - 10^{-1} (1ml) - 10^{-2} (1ml)	1 – 0,1 – 0,01	0,3	dividir por 10
4	10^{-1} (10ml) – 10^{-1} (1ml) – 10^{-2} (1ml)	1 – 0,1 – 0,01	0,3	dividir por 10
5	10^{-1} (1ml) – 10^{-2} (1ml) – 10^{-3} (1ml)	0,1 – 0,01 – 0,001	3	direto
6	10^{-2} (1ml) – 10^{-3} (1ml) - 10^{-4} (1ml)	0,01 – 0,001 – 0,0001	30	multiplicar por 10
	10^{-3} (1ml) - 10^{-4} (1ml) - 10^{-5} (1ml)	0,001 – 0,0001 - 0,00001	300	multiplicar por 100

*Entre parênteses o volume inoculado da diluição, onde SD = sem diluição (combinação restrita à amostras líquidas).

As regras para o cálculo dos resultados, com exemplos no Quadro 4.2 são:

Regra 1. Se as três diluições inoculadas correspondem às alíquotas tabeladas, o resultado é lido diretamente na linha correspondente à combinação de tubos positivos obtida (Exemplos 1 e 8 do Quadro 4.2).

Regra 2. Se as três diluições inoculadas não correspondem às alíquotas tabeladas, o resultado lido na linha correspondente à combinação de tubos positivos deve ser convertido segundo o fator de conversão do Quadro 4.1 (Exemplos 2 e 9 do Quadro 4.2).

Regra 3. Se mais de três diluições foram inoculadas, valem as regras um e dois, mas apenas três diluições consecutivas são consideradas.

3.a. Se mais de uma diluição apresentar todos os tubos positivos, a combinação considerada deve conter a maior diluição (menor alíquota) com todos os tubos positivos e as duas consecutivas (Exemplos 3, 4, 10 e 11 do Quadro 4.2).

3.b. Se nenhuma das diluições apresentou todos os tubos positivos, considerar as três primeiras consecutivas que tenham os tubos positivos na do meio (Exemplos 5 e 12 do Quadro 4.2).
3.c. Se uma diluição apresentar número de tubos positivos maior ou igual ao da diluição anterior, somar esse número ao da diluição anterior, desconsiderando a posterior (Exemplos 6 e 13 do Quadro 4.2).
3.d. Se todas as diluições apresentarem todos os tubos positivos, considerar as três últimas diluições consecutivas (maiores diluições, menores alíquotas) (Exemplos 7 e 14 do Quadro 4.2).

Quadro 4.2. Exemplos de cálculo dos resultados usando as tabelas de NMP.

Exemplo	Regra utilizada	Número de tubos positivos nas alíquotas (g ou ml)					Combinação considerada	Resultado
		0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
Série de três tubos (Tabela NMP-1)								
1	1	3	2	0	NI*	NI*	3-2-0	93 = 9,3x10^1
2	2	NI*	3	2	0	NI*	3-2-0	93x10 = 9,3x10^2
3	3a, 2	3	3	2	0	0	3-2-0	93x10 = 9,3x10^2
4	3a, 2	3	3	3	2	0	3-2-0	93x100 = 9,3x10^3
5	3b, 2	0	0	1	0	0	0-1-0	3x10 = 3,0x10^1
6	3c, 2	3	3	2	1	1	3-2-2	210x10 = 2,1x10^3
7	3d, 2	3	3	3	3	3	3-3-3	>1.100x100 = >1,1x10^5
Série de cinco tubos (Tabela NMP-2)								
8	1	5	2	0	NI*	NI*	5-2-0	49 = 4,9x10^1
9	2	NI*	5	2	0	NI*	5-2-0	49 x 10 = 4,9x10^2
10	3a, 2	5	5	2	0	0	5-2-0	49 x 10 = 4,9x10^2
11	3a, 2	5	5	5	2	0	5-2-0	49 x 100 = 4,9x10^3
12	3b, 2	0	0	1	0	0	0-1-0	1,8 x 10 =1,8x10^1
13	3c, 2	5	5	3	1	1	5-3-2	140x10 = 1,4x10^3
14	3d, 2	5	5	5	5	5	5-5-5	>1.600x100 = >1,6x10^5

* NI = Não inoculado

4.4.1.2. Cálculo usando a fórmula de Thomas (para diluições não decimais)

Thomas (1942) publicou uma fórmula simplificada de cálculo do NMP, que pode ser utilizada para calcular os resultados de amostras inoculadas em diluições não decimais. Pode ser também utilizada para amostras inoculadas com diluições decimais, porém, cujos resultados foram omitidos das tabelas de NMP. O cálculo pela fórmula permite considerar todas as diluições inoculadas, não apenas três. Os resultados podem não concordar exatamente com os da fórmula de Halvorson & Ziegler (1933), mais usada na construção de tabelas de NMP, mas a diferença é pequena e sem conseqüências praticas. A fórmula é a seguinte:

$$NMP/g \text{ ou ml} = P / \sqrt{NT}$$

P = Número de tubos positivos
N = Som a da quantidade de amostra inoculada em todos os tubos negativos
T = Soma da quantidade de amostra inoculada em todos os tubos

Exemplo 1. Considere as alíquotas e a combinação de tubos positivos e negativos na série de três tubos abaixo:

Alíquota	0,1g	0,01g	0,001g
Nº de tubos positivos em 3	0	2	0

P = 2
N = (3 x 0,1) + (1 x 0,01) + (3 x 0,001) = 0,313g
T = (3 x 0,1) + (3 x 0,01) + (3 x 0,001) = 0,333g
NMP/g = $2 / \sqrt{(0{,}313)x(0{,}333)}$ = 6,2

Exemplo 2. Considere as alíquotas e a combinação de tubos positivos e negativos na série de cinco tubos abaixo:

Alíquota	0,1g	0,01g	0,001g
Nº de tubos positivos em 5	0	2	0

P = 2
N = (5 x 0,1) + (3 x 0,01) + (5 x 0,001) = 0,535g
T = (5 x 0,1) + (5 x 0,01) + (5 x 0,001) = 0,555g
NMP/g = $2 / \sqrt{(0{,}535)x(0{,}555)}$ = 3,7

Exemplo 3. Considere as alíquotas de diluições 1:2 e a combinação de tubos positivos e negativos na série de cinco tubos abaixo:

Alíquota	8g	4g	2g	1g	0,5g	0,25g
Nº de tubos positivos em 5	5	4	2	0	1	0

P = 5 + 4 + 2 + 1 = 12
N = (1 x 4) + (3 x 2) + (5 x 1) + (4 x 0,5) + (5 x 0,25) = 18,25g
T = (5 x 8) + (5 x 4) + (5 x 2) (5 x 1) + (5 x 0,5) (5 x 0,25) = 78,75g
NMP/g = $12 / \sqrt{(18{,}25)x(78{,}75)}$ = 0,32

4.4.1.3. Cálculo dos resultados para amostras preparadas pela técnica do esfregaço de superfície ou da lavagem superficial

É feito da mesma forma descrita para a contagem em placas, porém, onde se lê UFC deve-se substituir por NMP e, onde se lê contagem em placas substituir por contagem pela técnica do NMP.

4.4.2. CÁLCULO DOS RESULTADOS DO TESTE DE DILUIÇÃO ÚNICA

Para a distribuição de dez alíquotas de 10g ou ml da amostra, pode ser utilizada a Tabela NMP-3 do Anexo. Para a distribuição de cinco alíquotas de 20g ou ml da amostra, pode ser utilizada a Tabela NMP-4 e para cinco alíquotas de 10g ou ml, a Tabela NMP-5. Considerando que o teste

de diluição única é aplicável principalmente para amostras líquidas com baixa contaminação, as tabelas apresentam o resultado em NMP/100ml da amostra. Não há, entretanto, restrição ao seu uso para amostras sólidas, se foram inoculadas as mesmas alíquotas, por exemplo, 10 x 100ml da diluição 10^{-1} em 100ml de caldo concentração dupla ou inoculação direta de 10 x 10g da amostra no caldo (se aplicável).

Para outras distribuições pode ser utilizada a fórmula abaixo, retirada do *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006).

$$\text{NMP/g ou ml} = (1/z) \times 2{,}303 \times \log_{10}(t/n)$$

z = peso ou volume de amostra por alíquota
t = número total de alíquotas inoculadas
n = número de alíquotas negativas

Regras para o cálculo usando a Tabela NMP-3

Regra 1. Para determinar o NMP/100ml ou g, na inoculação de 10 x 10ml ou g, basta ler o valor na linha correspondente ao número de tubos positivos obtido.

Exemplo 1. Inoculados 10 x 10ml da amostra e obtidos cinco tubos positivos - NMP/100ml = 6,9

Exemplo 2. Inoculadas 10 x 10g da amostra e obtidos três tubos positivos - NMP/100g = 3,6

Regra 2. Para determinar o resultado da inoculação de dez alíquotas com quantidade diferente de 10g ou ml, mas ainda múltiplas de dez, basta multiplicar (se a quantidade for menor que dez) ou dividir (se a quantidade for maior que dez) o valor lido na Tabela NMP-3.

Exemplo 3. Inoculadas 10 x 1g da amostra e obtidos nove tubos positivos - NMP/100g = 23x10= $2{,}3\times10^{2}$

Exemplo 4. Inoculadas 10 x 100g da amostra e obtidos nove frascos positivos - NMP/100g = 23/10 = 2,3

Regra 3. Para converter o resultado de NMP/100ml ou g para NMP/ml ou g, basta dividir o valor por 100.

Exemplo 5. Inoculados 10 x 1ml da amostra e obtidos nove tubos positivos - NMP/100ml = 23x10 = $2{,}3\times10^{2}$ e NMP/ml = 2,3

Cálculo pela fórmula

O cálculo é muito simples, conforme exemplo abaixo:

Exemplo 6. Inoculadas cinco alíquotas de 25g e obtidos dois frascos positivos
z = 25, t = 5, n = 3 – NMP/g = $(1/25) \times 2{,}303 \times \mathrm{Log}_{10}(5/3) = 0{,}02$ ou NMP/100g = 2

Cálculo para amostras preparadas pela técnica do esfregaço de superfície ou da lavagem superficial

Para calcular os resultados de amostras preparadas pela técnica do esfregaço de superfície ou da lavagem superficial, seguir a mesma orientação do teste de diluição múltipla.

4.5 REFERÊNCIAS

BLODGETT, R., 2006. Appendix 2 - Most Probable Number from Serial Dilutions. In: US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online*, Revision February 2006. Disponível no site (acesso em 15/10/09): http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacteriological Analytical Manual BAM/default.htm.

EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W. & GREENBERG, A.E. (Eds). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005.

GREENBERG A. E., TRUSSEL R. R., CLESCERI L.S. (Eds.). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF), 1985.

HALVORSON, H.O. & ZIEGLER, N.R., 1933. Application of statistics to problems in bacteriology. *Journal of Bacteriology 25*:101-121.

ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: *General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions, 1st ed.* The International Organization for Standardization, 1999.

SWANSON, K.M.J, PETRAN, R.L. & HANLIN, J.H. Culture methods for enumeration of microrganisms. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 6, p.53-67.

THOMAS, H.A., 1942. Bacterial densities from fermentation tube tests. *Journal of The American Water Works Association 34*:572-576.

ANEXO 4.1

TABELAS DE NMP

Tabela NMP-1. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada da amostra: 0,1 - 0,01 e 0,001g ou ml.

Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006).

Tabela NMP-2. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de cinco tubos. Quantidade inoculada da amostra: 0,1 - 0,01 e 0,001g ou ml.

Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<1,8	-	6,8	4-0-3	25	9,8	70
0-0-1	1,8	0,09	6,8	4-1-0	17	6	40
0-1-0	1,8	0,09	6,9	4-1-1	21	6,8	42
0-1-1	3,6	0,7	10	4-1-2	26	9,8	70
0-2-0	3,7	0,7	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5,5	1,8	15	4-2-0	22	6,8	50
0-3-0	5,6	1,8	15	4-2-1	26	9,8	70
1-0-0	2	0,1	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4	0,7	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6	1,8	15	4-3-0	27	9,9	70
1-1-0	4	0,7	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6,1	1,8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8,1	3,4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6,1	1,8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8,2	3,4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8,3	3,4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3,5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	11	3,5	22	5-0-0	23	6,8	70
2-0-0	4,5	0,79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6,8	1,8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9,1	3,4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6,8	1,8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9,2	3,4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4,1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9,3	3,4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4,1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5,9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4,1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5,9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5,9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7,8	2,1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3,5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5,6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3,5	26	5-3-3	180	70	400
3-1-1	14	5,6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5,7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6,8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6,8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6,8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6,8	40	5-4-5	430	150	1.100
3-3-2	24	9,8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6,8	40	5-5-1	350	100	1.100
3-4-1	24	9,8	70	5-5-2	540	150	1.700
3-5-0	25	9,8	70	5-5-3	920	220	2.600
4-0-0	13	4,1	35	5-5-4	1.600	400	4.600
4-0-1	17	5,9	36	5-5-5	>1.600	700	-
4-0-2	21	6,8	40				

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006).

Tabela NMP-3. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de 10 alíquotas de 10g ou ml da amostra por tubo.

Número de tubos positivos	NMP/100ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo
0	<1,1	-	3,3
1	1,1	0,05	5,9
2	2,2	0,37	8,1
3	3,6	0,91	9,7
4	5,1	1,6	13
5	6,9	2,5	15
6	9,2	3,3	19
7	12,0	4,8	24
8	16	5,9	33
9	23	8,1	53
10	>23	12	-

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006).

Tabela NMP-4. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de cinco alíquotas de 20g ou ml da amostra por tubo.

Número de tubos positivos	NMP/100ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo
0	<1,1	-	3,5
1	1,1	0,051	5,4
2	2,6	0,40	8,4
3	4,6	1,0	13
4	8,0	2,1	23
5	>8,0	3,4	-

Fonte: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed.* (Eaton *et al.*, 2005).

Tabela NMP-5. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos e negativos na inoculação de cinco alíquotas de 10g ou ml da amostra por tubo.

Número de tubos positivos	NMP/100ml	Intervalo de confiança (95%) (valores aproximados)	
		Mínimo	Máximo
0	<2,2	0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16,0	3,3	52,9
5	>16,0	8,0	-

Fonte: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed.* (Greenberg *et al.*, 1985).

Capítulo 5

Técnicas Básicas de Detecção da Presença/Ausência de Microrganismos

5.1. INTRODUÇÃO

As orientações contidas nesse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas nos Capítulos 4 e 5 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (Bier *et al.*, 2001, Sperber *et al.*, 2001).

Vários ensaios utilizados na análise de alimentos são qualitativos (presença/ausência), incluindo os de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* sp, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*. Todos utilizam as mesmas técnicas microbiológicas básicas, que são o enriquecimento em um ou mais caldos específicos e o posterior isolamento em meios sólidos. A principal razão para que esses ensaios sejam qualitativos é a etapa de enriquecimento, que dificulta a quantificação, embora seja possível, se indispensável, utilizar a técnica do NMP nesses casos. Para tanto, é necessário repetir o mesmo ensaio de presença/ausência para várias alíquotas da mesma amostra, sendo pelo menos nove, num teste de diluição múltipla ou cinco, num teste de diluição única. Em função disso, a quantificação se torna excessivamente trabalhosa e dispendiosa, não sendo necessária e nem justificável, na maioria das situações.

Enriquecimento

O enriquecimento é uma etapa crítica nos ensaios de presença/ausência, por três razões. A primeira é que a população dos patógenos nas amostras é normalmente baixa (muito abaixo do limite de detecção da contagem em placas), sendo necessário elevar o número de células a quantidades detectáveis. Não é incomum produtos com população menor do que uma célula por 100g e há casos de detecção de quantidades tão baixas como uma célula por 500g do produto. A segunda razão é que, na maioria dos alimentos industrializados, as células do microrganismo alvo estão injuriadas pelo processamento, sendo necessária a recuperação das injúrias. Células injuriadas exigem um período de tempo em condições ótimas de crescimento, para reativação das vias metabólicas responsáveis pela multiplicação. A terceira razão é que, normalmente, a microbiota competidora nas amostras se encontra em número muito maior do que o microrganismo alvo, sendo necessário inibir o crescimento dessa população, para que o alvo tenha oportunidade de se multiplicar.

O enriquecimento pode incluir uma ou mais etapas, dependendo do microrganismo alvo. Nos ensaios de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, por exemplo, é feito em duas etapas. Nos ensaios de *Vibrio cholerae* e *Yersinia enterocolitica* é feito em apenas uma. Quando há duas etapas é comum

chamar a primeira de pré enriquecimento ou enriquecimento primário e a segunda de enriquecimento seletivo.

O pré enriquecimento tem por objetivo a reparação de células injuriadas, oferecendo condições para a sua recuperação, porém, sem favorecer demasiadamente a microbiota competidora. De maneira geral, células injuriadas não crescem em condições altamente seletivas, por isso, os caldos de pré enriquecimento normalmente são não seletivos ou moderadamente seletivos. O pH do meio deve estar na faixa ótima de crescimento do alvo e, após a inoculação de produtos ácidos, deve ser ajustado para retornar ao ótimo, se houver alteração. Para microrganismos que têm pH ótimo fora da faixa neutra (*Vibrio cholerae*, por exemplo, com ótimo na faixa alcalina), o pH do caldo pode oferecer uma vantagem competitiva em relação à microbiota acompanhante. A temperatura de incubação também deve estar na faixa ótima, mas o tempo de incubação deve ser apenas o suficiente para a recuperação das injúrias. Durante a fase de recuperação, a multiplicação das células injuriadas é mínima e, se a incubação for prolongada além do necessário, a população competidora pode aumentar demasiadamente, dificultando ou impedindo a posterior detecção do alvo.

O enriquecimento seletivo objetiva inibir a microbiota competidora presente nas amostras, favorecendo a multiplicação do microrganismo alvo. Isso é conseguido através da utilização de agentes seletivos e/ou condições restritivas para a microbiota competidora, que podem ser: o pH do meio de cultura, a temperatura e/ou atmosfera de incubação, a adição de antibióticos (polimixina B, ampicilina, moxalactam, novobiocina, D-cicloserina, oxitetraciclina, vancomicina, trimethiprima, cicloeximida) e a adição de compostos químicos (verde brilhante, selenito de sódio, sais biliares, telurito de potássio, lauril sulfato de sódio). A composição nutricional do meio deve ser ótima e, se possível, conter nutrientes utilizados preferencialmente pelo alvo, como fontes de carbono não comuns (D-manose, sorbitol, citrato de sódio, por exemplo). Nem sempre os caldos de enriquecimento seletivo conseguem um balanceamento ideal entre a necessidade de inibir os competidores sem inibir o microrganismo alvo. Eventualmente, algumas cepas do alvo podem ser sensíveis às condições seletivas presentes e, nesses casos, é comum a utilização de mais de um meio de enriquecimento seletivo. Esse é o caso, por exemplo, do ensaio para *Salmonella*, que utiliza dois caldos.

Isolamento em meios sólidos (plaqueamento diferencial)

Uma vez conseguida a multiplicação no(s) caldo(s) de enriquecimento, é necessário diferenciar e separar o microrganismo alvo da microbiota competidora. Isso é feito na etapa de isolamento em meios sólidos, que permite também a obtenção de culturas puras, para utilização em testes de confirmação da identidade. De maneira geral, os meios de isolamento são seletivos e diferenciais, para suprimir parte da microbiota competidora e distinguir o alvo da remanescente.

Os agentes seletivos usados em meios sólidos são os mesmos usados nos meios líquidos de enriquecimento, selecionados em função do ensaio. Os agentes diferenciais mais usados são os indicadores de pH, para diferenciar os microrganismos que produzem dos que não produzem ácido ou base durante o crescimento. Os indicadores de pH mudam de cor em determinadas faixas de pH e os mais utilizados em meios de cultura são o vermelho de fenol e o púrpura de bromocresol. Os indicadores de sulfeto de hidrogênio (H_2S) também são bastante usados, para diferenciar os microrganismos que produzem dos que não produzem esse composto no metabolismo de aminoácido sulfurados. Os indicadores de H_2S são compostos de ferro como o citrato férrico, o citrato férrico amoniacal ou o sulfato férrico amoniacal. Ao reagir com o H_2S, é

produzido sulfeto de ferro, um composto preto e solúvel que se difunde e provoca o escurecimento do meio de cultura. Outros agentes diferenciais são a gema de ovo, para diferenciar os microrganismos que produzem dos que não produzem enzimas lipolíticas, a esculina, para diferenciar os microrganismos que hidrolizam dos que não hidrolizam esse composto e o sangue, para diferenciar os microrganismos que produzem dos que não produzem hemólise.

Assim como no enriquecimento seletivo, algumas cepas do alvo podem ser sensíveis às condições seletivas dos meios de plaqueamento. Nesses casos, é comum a utilização de mais de um meio, como é o caso do ensaio de *Salmonella*, por exemplo, que utiliza dois ou três.

Confirmação

Essa etapa objetiva confirmar a identidade da cultura isolada, através de testes que verificam características típicas do(s) microrganismo(s) alvo. As características mais usadas na confirmação são as morfológicas, as bioquímicas e as sorológicas.

As características morfológicas incluem principalmente a forma das células (cocos, bastonetes retos, bastonetes curvos, helicoidais), o arranjo das células (isoladas, em pares, em tétrades, em cadeias, em cachos, em filamentos) a coloração de Gram, a motilidade e a formação de esporos. As características sorológicas incluem principalmente a verificação da presença dos antígenos somáticos "O" da parede celular e dos antígenos flagelares "H". As características bioquímicas dependem do microrganismo alvo e são apresentadas nos capítulos específicos. Os testes mais utilizados são os descritos abaixo (Silva, 1996):

Teste de catalase. Objetiva verificar se a bactéria é capaz de produzir a enzima catalase, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio (água oxigenada) é um metabólito formado durante a utilização aeróbica dos carboidratos. É tóxico e pode provocar a morte das células se não for rapidamente decomposto. A decomposição desse material ocorre através da ação das enzimas classificadas como hidroperoxidases, que incluem a peroxidase e a catalase (peróxido de hidrogênio redutase). A maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que contêm citocromo também apresentam catalase. A maioria das bactérias anaeróbias, como *Clostridium* sp, por exemplo, possuem peroxidase em lugar da catalase. As bactérias que não apresentam catalase ou peroxidase não são capazes de decompor o peróxido de hidrogênio, tendo seu crescimento inibido pelo acúmulo desse produto do seu próprio metabolismo.

Teste de citrato. Objetiva verificar se a bactéria é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono para crescimento. No teste, a única fonte de carbono disponível no meio de cultura é o citrato. Se a bactéria dispõe do aparato metabólico necessário à assimilação do citrato, ocorrerá multiplicação. O crescimento pode ser observado visualmente, pelo acúmulo de massa celular ou por viragem de indicador de pH. Em caso negativo, não haverá crescimento.

Testes de descarboxilação de aminoácidos. Objetivam verificar se a bactéria é capaz de descarboxilar aminoácidos formando aminas, com a conseqüente alcalinização do meio de cultura. A descarboxilação é dependente da disponibilidade de enzimas de descarboxilação, específicas para cada aminoácido. Apenas os aminoácidos que apresentam pelo menos um grupo químico ativo, além dos grupos amina e carboxila, são passíveis de descarboxilação A disponibilidade de uma ou mais descarboxilases varia entre as espécies e representa uma característica útil na diferenciação. As descarboxilases mais utilizadas em testes de identificação são a arginina, lisina e ornitina descarboxilases, enzimas indutíveis produzidas pelas bactérias apenas na presença dos respectivos aminoácidos e em condições ácidas. O metabolismo de descarboxilação é um processo

anaeróbio que resulta em cadaverina e CO_2 a partir da lisina e putrescina e CO_2 a partir da ornitina. O metabolismo da arginina é mais complexo e envolve duas vias metabólicas que podem operar simultânea ou separadamente: a via da arginina descarboxilase e a via da arginina deidrolase. Na via da descarboxilase, a arginina é inicialmente degradada a agmatina que, por sua vez, será posteriormente degradada a putrescina e uréia, pela enzima agmatinase. Nas bactérias urease positivas, a uréia ainda será degradada a duas moléculas de amônia. Na via da deidrolase, a arginina é inicialmente degradada a L-citrulina que, por sua vez, será posteriormente degradada a L-ornitina, CO_2 e NH_3, pela enzima citrulina ureidase. Independente de qual via seja utilizada pela bactéria no metabolismo da arginina, os produtos finais do processo serão alcalinos e produzirão o mesmo resultado no teste.

Teste de fenilalanina deaminase. Objetiva verificar se a bactéria é capaz de desaminar o aminoácido fenilalanina. A desaminação ocorre na presença de oxigênio, sob a ação de uma aminoácido oxidase, flavoproteína que catalisa a conversão de uma molécula de fenilalanina em uma molécula de ácido fenilpirúvico e uma molécula de amônia. O ácido fenilpirúvico pode ser detectado no meio de cultura através da adição do cloreto férrico, que reage com o ácido fenilpirúvico formando um produto colorido, a fenilhidrazona.

Testes de fermentação de carboidratos. Objetivam verificar se a bactéria é capaz de fermentar determinados carboidratos, produzindo ácido com ou sem gás. Vias metabólicas de fermentação de diferentes carboidratos são características das espécies, sendo um dos caracteres de fenótipo mais utilizados na identificação de bactérias. Os processos fermentativos são seqüências de reações de óxido-redução que transformam a glucose em um ou mais compostos de carbono, gerando energia no final. O tipo(s) de produto(s) final(ais) da oxidação da glucose, ou seja, o tipo de fermentação, varia de espécie para espécie bacteriana, incluindo ácidos, álcoois, CO_2 e H_2. A entrada de um carboidrato diferente da glucose nos processos fermentativos depende da capacidade de cada espécie para introduzir o carboidrato na célula, convertê-lo em glucose e então realizar a fermentação. O termo carboidratos, de maneira geral, inclui os compostos abaixo, além do inositol, que é um composto não-derivado de carboidratos, porém, também testado nos ensaios de fermentação:

- Monossacarídeos: Eritritose (tetrose), Ribose, Xilose, Arabinose (pentoses), Glucose, Frutose, Galactose (hexoses)
- Dissacarídeos: Maltose (glucose + glucose), Sacarose (glucose + frutose), Lactose (glucose + galactose)
- Trissacarídeos: Rafinose
- Polissacarídeos: Amido, Inulina
- Açúcares-álcool: Adonitol, Dulcitol, Manitol, Sorbitol

Teste de indol. Objetiva verificar se a bactéria é capaz de desaminar o aminoácido triptofano. A desaminação do triptofano depende da disponibilidade pelas bactérias do complexo enzimático triptofanase, que desamina o triptofano resultando em indol, ácido pirúvico, amônia e energia. O indol liberado para o meio de cultura pode ser detectado por uma reação química com o aldeído presente no reagente de Kovacs para teste de indol (p-dimetilamino benzaldeído), que resulta em produtos de condensação coloridos. Esses compostos, de cor vermelho-violeta, ficam concentrados na fase alcoólica do reagente, formando um anel na superfície do meio de cultura líquido.

Teste de malonato. Objetiva verificar se a bactéria é capaz de utilizar o malonato de sódio como fonte de carbono para crescimento, com resultante alcalinização do meio de cultura. O

malonato é um composto que apresenta a característica de inibir a atividade da enzima succinato desidrogenase, essencial à atividade metabólica das bactérias para a produção de energia. Dependendo da concentração do malonato presente, a multiplicação dos microrganismos pode ser parcial ou completamente inibida, a menos que as células sejam capazes de utilizar o próprio malonato como fonte de carbono e energia. Quando uma bactéria é capaz de utilizar o malonato, também é capaz de utilizar o sulfato de amônia como única fonte de nitrogênio, gerando como produto final de metabolismo o hidróxido de sódio. Assim, adicionando-se sulfato de amônia ao meio de cultura, as bactérias malonato-positivas provocarão uma elevação do pH do meio, pelo acúmulo de hidróxido de sódio. Essa alcalinização pode ser detectada pelo azul de bromotimol, um indicador de pH com ponto de viragem em 7,6.

Teste de oxidação/fermentação (O/F). Objetiva verificar o tipo de metabolismo de carboidratos utilizado pela bactéria ou a não utilização de carboidratos. A utilização de carboidratos para produção de energia nas bactérias pode ocorrer por dois processos, o oxidativo (respiração celular) e o fermentativo. O metabolismo oxidativo é um processo aeróbio para a maioria das bactérias, isto é, só ocorre na presença do oxigênio como aceptor final de elétrons, embora algumas espécies sejam capazes de crescer substituindo o oxigênio por compostos inorgânicos como o nitrato e o sulfato (respiração anaeróbia). O metabolismo fermentativo, ao contrário, é um processo anaeróbio e não depende da disponibilidade de oxigênio. As bactérias que utilizam o metabolismo oxidativo dependente do oxigênio são chamadas de aeróbias estritas, uma vez que seu crescimento só ocorre na presença de O_2. As bactérias que utilizam tanto o metabolismo oxidativo quanto o fermentativo são chamadas de anaeróbias facultativas, porque podem crescer tanto na presença quanto na ausência de O_2. O carboidrato normalmente adicionado aos meios teste de oxidação fermentação é a glucose, porque é utilizado pela maioria das bactérias. Se o metabolismo da glicose for estritamente oxidativo ou oxidativo e fermentativo, o dos demais também será, não havendo necessidade de testar um a um. Por outro lado, algumas bactérias são incapazes de utilizar a glicose, embora possam utilizar outros carboidratos. Também há bactérias que são incapazes de utilizar qualquer tipo de carboidrato, como o *Campylobacter*, por exemplo, que deriva sua energia de aminoácidos ou de ácidos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico.

Teste de oxidase. Objetiva verificar a presença da enzima citocromo C, uma das oxidases que participam do processo oxidativo de respiração celular. O metabolismo de respiração celular nas bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas apresenta, como etapa final do processo, o sistema de transporte de elétrons. Esse sistema é uma seqüência de reações de óxido redução, em que elétrons são transferidos de um substrato para outro, com a produção de energia. No final da cadeia, o aceptor final de elétrons, que se oxida para manter o sistema funcionando, é o oxigênio, que recebe os elétrons transportados pelos substratos anteriores. Para que a transferência de elétrons para o oxigênio possa ocorrer é necessária a participação de um grupo especial de enzimas de transporte de elétrons, as citocromo oxidases, presentes em todas as bactérias que utilizam o metabolismo respiratório. O tipo e o número de citocromo oxidases presentes na cadeia de transporte de elétrons de diferentes bactérias é uma característica das espécies, utilizada como caráter de identificação. O teste de oxidase detecta especificamente uma dessas oxidases, a citocromo C oxidase, que não se encontra presente em todas as bactérias capazes de utilizar o metabolismo respiratório. No teste, o reagente utilizado é sempre um agente redutor artificial que atua como aceptor final dos elétrons transferidos pela citocromo oxidase C. Esses reagentes apresentam a característica de mudar de cor ao passar do estado reduzido para o oxidado, de forma que, ao receber os elétrons, oxidam-se, provocando uma reação colorida visível.

Teste de redução do nitrato. Objetiva verificar se a bactéria é capaz de reduzir o nitrato a nitrito ou a gás nitrogênio livre. A redução do nitrato (NO_3^-) é um processo usualmente anaeróbio e o produto final da redução varia em função da espécie bacteriana, podendo incluir o nitrito (NO_2^-), a amônia (NH_3), o gás nitrogênio (N_2), o óxido nítrico (NO), o óxido nitroso (N_2O) e a hidroxilamina (R-NH-OH). Os mais comuns são o nitrito e, no caso das bactérias também capazes de reduzir o nitrito, o gás nitrogênio resultante dessa redução. A redução completa do nitrato a gás nitrogênio (via nitrito ou óxido nitroso) é chamada denitrificação. Os produtos da redução podem ser utilizados ou não no metabolismo das bactérias, dependendo das condições ambientais. Quando não utilizados são excretados para o meio de cultura, onde podem ser detectados. O nitrito pode ser detectado através de uma reação colorida com os reagentes para teste de nitrato, uma mistura de α-naftilamina e ácido sulfanílico, que reagem com o nitrito formando um composto diazônico colorido. Alternativamente, se o meio estiver isento de produtos da redução do nitrato, a ocorrência do processo pode ser comprovada pela ausência do nitrato originalmente acrescentado ao meio de cultura. Essa verificação é feita com zinco, capaz de provocar uma reação colorida com qualquer nitrato presente no meio, indicativa de não redução. Não ocorrendo reação, pode-se concluir que o nitrato foi reduzido.

Teste de urease. Objetiva verificar se a bactéria produz a enzima urease, responsável pela decomposição da uréia em amônia. A urease é uma enzima do grupo das amidases, que catalisam a hidrólise de amidas como a uréia, uma diamida do ácido carbônico ou carbamida. A hidrólise de cada molécula de uréia resulta em duas moléculas de amônia, que elevam o pH do meio de cultura e podem ser detectadas pelo vermelho de fenol, um indicador de pH com ponto de viragem em pH 8,4.

Teste de vermelho de metila (VM). Objetiva verificar se o metabolismo fermentativo da bactéria é do tipo ácido misto. A fermentação da glicose pelas bactérias pode resultar em diferentes produtos finais de fermentação, sendo o tipo de metabolismo fermentativo uma característica das espécies. Na fermentação ácido mista, o produto final é uma mistura de ácidos (2 glicose + 1 $H_2O \Rightarrow$ 2 ácido lático + 1 ácido acético + 2 ácido fórmico + 1 etanol) que reduzem o pH do meio para menos de 4,5. Essa redução acentuada do pH, que supera a capacidade tamponante do tampão fosfato presente, pode ser detectada adicionando-se à cultura algumas gotas de solução de vermelho de metila, um indicador de pH com ponto de viragem abaixo de 4,5.

Teste de Voges-Proskauer (VP). Objetiva verificar se a bactéria produz butilenoglicol (butanodiol) como produto final de fermentação da glicose. Na fermentação butilenoglicólica, o produto final é precedido por um precursor intermediário, a acetoína (acetilmetilcarbinol), convertida em butilenoglicol pela ação da diacetil redutase. A acetoína pode ser detectada no teste de VP, através da adição dos reagentes Barrit para teste de VP. Primeiramente é adicionada uma solução alcoólica 5% de α-naftol, que atua como catalisador para a reação com o reagente seguinte, uma solução concentrada de hidróxido de potássio ou sódio. O 2º atua como agente oxidante para a oxidação da acetoína a diacetil. O diacetil reage com os núcleos guanidina da peptona do meio, formando um produto de condensação avermelhado que, à medida em que é formado, combina-se com o α-naftol, acelerando a reação e intensificando a cor.

5.2. MATERIAL REQUERIDO NAS ANÁLISES

- Material para preparação da amostra, descritos nos capítulos específicos
- Meios de cultura recomendados para o ensaio a ser realizado, descritos nos capítulos específicos
- Estufa(s) incubadora ou banho(s) maria regulado(s) na(s) temperatura(s) especificada(s) pelo ensaio a ser realizado, descrita(s) nos capítulos específicos

5.3. PROCEDIMENTO

Antes de iniciar o procedimento, observar os cuidados descritos no Capítulo 2, para garantir que as atividades sejam conduzidas sob condições assépticas. Identificar todos os frascos, tubos e placas que serão inoculados, com o código da amostra e a sigla do meio de cultura contido.

a) Pré enriquecimento

Nos ensaios que utilizam uma única etapa de enriquecimento, essa etapa não é de pré enriquecimento, mas sim, de enriquecimento seletivo.

Para a inoculação da amostra, seguir as orientações dos capítulos específicos para cada ensaio. A maioria deles utiliza os mesmos procedimentos de preparação de amostras descritos no Capítulo 2, substituindo o diluente pelo caldo de pré enriquecimento. A diluição padrão da amostra no caldo é de 1:10 (uma parte da amostra para nove partes de caldo). Para a incubação do(s) caldo(s) de enriquecimento seletivo, seguir as orientações dos capítulos específicos.

Composição de amostras a seco. Na análise de diversas unidades de amostra de lotes, é comum a prática de compor as amostras, coletando-se uma unidade analítica de cada e juntando todas numa única amostra composta. A essa amostra composta adiciona-se o caldo de pré-enriquecimento, na quantidade necessária para diluição 1:10. Como esse volume normalmente é grande, recomenda-se que a temperatura do caldo, no momento da inoculação, seja a mesma da incubação. Esse cuidado evita que a amostra inoculada permaneça por muito tempo nas estufas antes de atingir a temperatura de incubação. Para alimentos que não permitam a obtenção de uma amostra composta homogênea, pode-se fazer a composição úmida, descrita no item abaixo.

b) Enriquecimento seletivo

Esse item aplica-se apenas aos ensaios que utilizam duas etapas de enriquecimento.

Agitar cuidadosamente o frasco de pré enriquecimento e transferir uma alíquota para o caldo de enriquecimento seletivo. A proporção entre o volume da alíquota e o volume do caldo é de uma parte para dez, na maioria dos ensaios, mas há exceções, devendo ser consultados os capítulos específicos. Se mais de um caldo for utilizado no ensaio, transferir uma alíquota para o segundo caldo de maneira similar. Para a incubação do(s) caldo(s) de enriquecimento seletivo, seguir as orientações dos capítulos específicos.

Se foi feita a composição a seco de várias amostras no pré enriquecimento, o volume da alíquota de caldo de pré enriquecimento a ser transferida para o(s) caldo(s) de enriquecimento seletivo deve ser multiplicada pelo número de unidades de amostra compostas. O volume do(s) caldo(s) de enriquecimento seletivo também deve ser multiplicado pelo número de unidades de amostras compostas, para manter a proporção.

Composição úmida de amostras em ensaios com duas etapas de enriquecimento. Se não foi feita a composição a seco, nessa etapa pode ser feita a composição úmida de várias amostras pré enriquecidas, compondo os caldos de pré enriquecimento obtidos. Para tanto, uma alíquota de cada caldo de pré enriquecimento é transferida para um mesmo frasco de caldo de enriquecimento seletivo. Nesse caso, o volume do caldo de enriquecimento seletivo deve ser suficiente para manter a proporção recomendada de pré enriquecimento a ser transferido. Para a prática de transferir 1ml do caldo de pré enriquecimento para 10ml do caldo de enriquecimento seletivo, por exemplo, são necessários 100ml do caldo de enriquecimento seletivo para compor 10 amostras. Se, no caso de presença, for importante determinar qual unidade de amostra está contaminada, é possível preservar cada unidade pré enriquecida sob refrigeração e analisar individualmente depois.

Composição úmida em ensaios com uma única etapa de enriquecimento. Nesse caso, transferir uma alíquota de 1ml de cada caldo enriquecido para um mesmo tubo estéril vazio, homogeneizar bem em um agitador tipo “vortex” e utilizar essa amostra composta na etapa de plaqueamento diferencial subsequente.

c) Plaqueamento diferencial

Nos ensaios de duas etapas de enriquecimento, o plaqueamento diferencial é feito a partir do(s) caldo(s) de enriquecimento seletivo. Nos ensaios de uma única etapa, é feita a partir do único caldo de enriquecimento.

A partir de cada tubo ou frasco de caldo enriquecido, estriar uma alçada na superfície do meio de cultura seletivo diferencial recomendado para o ensaio, nos capítulos específicos. Se mais de um meio de plaqueamento for recomendado para o ensaio, repetir esse procedimento em cada meio utilizado. A inoculação deve ser feita por estrias de esgotamento, conforme descrito abaixo, para obter culturas puras em colônias isoladas. A incubação das placas deve ser feita da forma recomendada para o ensaio, nos capítulos específicos.

c.1) Técnica de inoculação por estrias de esgotamento para obter culturas puras. As estrias são feitas da seguinte forma: com uma alça de inoculação, transferir uma alçada da cultura para um ponto da superfície do meio, bem próximo à parede da placa. A partir desse ponto, puxar a alça em movimentos de vai-e-vem, fazendo linhas bem próximas umas das outras, em metade da placa, conforme mostrado na Figura 5.1. As linhas não devem encostar umas nas outras, sendo mantido um pequeno ângulo entre uma e outra. Atingida a metade da placa, flambar a alça, aguardar resfriar e tocar em um ponto da metade inoculada, próximo à parede da placa. A partir desse ponto, puxar o inóculo para fora da metade inoculada e descrever novas linhas, ocupando um quarto da placa. As novas linhas não devem tocar as primeiras. Flambar novamente a alça, aguardar esfriar e, a partir da segunda série de estrias, puxar novamente o inóculo para o último quarto não inoculado da placa, descrevendo novas linhas em toda a área restante. Não tocar nenhuma das estrias feitas anteriormente. A cada série de estrias o inóculo é menor, porque foi sendo esgotado na série anterior. Assim, no último quadrante inoculado, é provável a obtenção de colônias isoladas.

d) Seleção de colônias e repique de culturas para confirmação

A confirmação é feita a partir das colônias com características típicas do microrganismo alvo, descritas nos capítulos específicos. Na ausência de colônias típicas, o ensaio é dado como concluído e o resultado como ausência, mesmo que outros tipos de colônias estejam presentes. Há exceções em que se recomenda utilizar colônias atípicas, na ausência das típicas. Essas exceções são apresentadas nos capítulos específicos.

Havendo colônias típicas, deve ser feito o isolamento da cultura, transferindo-se uma pequena parte da massa de células para um ou mais meios de isolamento. O número de colônias que devem ser isoladas para a confirmação varia com o ensaio, assim como os meios de isolamento, devendo ser seguidas as orientações dos capítulos específicos. De maneira geral, pelo menos duas colônias típicas de cada meio de plaqueamento diferencial são submetidas à confirmação, para aumentar a chance de isolar uma que seja do microrganismos alvo. Para o isolamento, a placa deve conter colônias isoladas, pelo menos no último quarto inoculado. Se isso não ocorrer, uma alçada da cultura na placa deve ser novamente inoculada por estrias de esgotamento, em outra placa do mesmo meio. Esse procedimento deve ser repetido tantas vezes quantas necessárias, até obter placas com colônias isoladas. Utilizar a técnica descrita abaixo para a repicar a cultura das colônias nos meios de isolamento, de forma a transferir culturas puras.

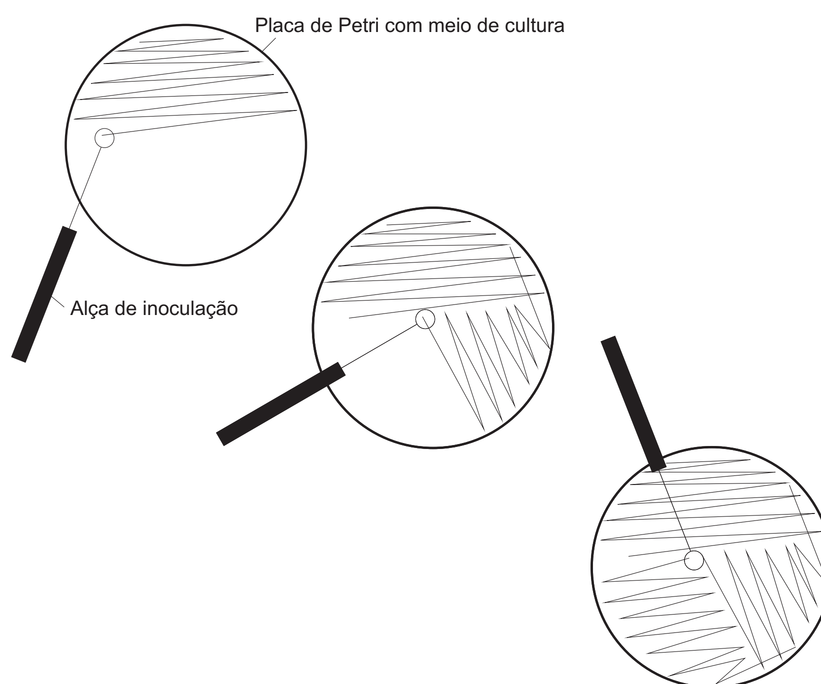


Figura 5.1. Técnica de inoculação por estrias de esgotamento.

Técnica de repique de culturas puras a partir de colônias isoladas em placas. As placas normalmente contém colônias típicas e, também, colônias atípicas de vários tipos, que são da microbiota competidora. Para garantir que a cultura tomada de uma colônia típica esteja pura, a retirada do inóculo deve ser feita com agulhas, nunca com alças de inoculação. Com a ponta da agulha, tocar levemente o centro da colônia, em sua parte mais alta, de forma a retirar uma quantidade mínima da massa de células. Não tocar qualquer outra região da colônia ou do meio de cultura em redor, porque isso aumenta o risco de carregar os contaminantes. Nunca remover toda a colônia. Uma quantidade mínima de inóculo, mesmo que não possa ser vista, é suficiente para inocular vários meios de isolamento. Os meios normalmente estão contidos em tubos, podendo ser sólidos (inclinados ou não), semi-sólidos ou líquidos. Os meios semi-sólidos e os sólidos não inclinados são inoculados por picada, sem atingir o fundo do tubo. Os meios sólidos inclinados são inoculados fazendo-se uma picada, sem atingir o fundo e, depois, estrias na rampa. Os meios líquidos são inoculados introduzindo-se a agulha até uma profundidade próxima do fundo e agitando levemente (há exceções, apresentadas nos capítulos específicos). Na inoculação de vários tubos, não flambar a agulha nem tomar um novo inóculo entre um tubo e outro. Incubar os tubos nas condições descritas para o ensaio, nos capítulos específicos.

e) Testes de confirmação

Os testes requeridos na confirmação são definidos nos capítulos específicos. Os capítulos também apresentam o procedimento para a realização dos testes, exceto os procedimentos básicos de coloração de Gram, coloração de esporos e preparação de montagens úmidas, apresentados abaixo.

e.1) Coloração de Gram (método de Hucker). Preparar um esfregaço da cultura da seguinte forma: Se a cultura estiver em meio sólido, colocar uma gota de solução salina (NaCl

0,85%) sobre uma lâmina de vidro limpa e seca e emulsionar uma alçada da cultura com a solução salina. Se a cultura estiver em caldo, agitar o caldo e colocar uma alçada sobre a lâmina de vidro. Aguardar que o líquido seque naturalmente e, então, fixar o esfregaço pelo calor, passando rapidamente a lâmina pela chama do bico de Bunsen, por três vezes. Corar da seguinte forma:

- Cobrir o esfregaço com Solução de Cristal Violeta de Hucker e manter em contato por um minuto.
- Lavar em água corrente (fluxo de água bem leve) e cobrir com Solução de Iodo (Lugol) por um minuto.
- Lavar em água corrente e secar com lenço de papel ou papel de filtro, tocando levemente, sem esfregar.
- Lavar em seguida com etanol, até que não haja mais desprendimento de corante (30 segundos).
- Lavar em água corrente e cobrir com Solução de Safranina por 30 segundos.
- Lavar em água corrente e secar com papel absorvente (lenço de papel ou papel de filtro, sem esfregar, apenas tocando o esfregaço com o papel). Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão. As células das bactérias Gram positivas vão ficar coradas de roxo e as das Gram negativas de vermelho, podendo também ser observadas a morfologia e o arranjo das células.

e.2) Coloração de esporos (Método de Schaeffer-Fulton). Preparar um esfregaço da cultura, da mesma forma indicada para a coloração de Gram. Corar da seguinte forma:

- Cobrir o esfregaço com Solução de Verde Malaquita 5% aquosa e corar a quente durante cinco minutos. Para aquecer a solução de verde de malaquita, segurar a lâmina sobre um banho ou frasco com água sob fervura.
- Após o tempo de contato recomendado, lavar em água corrente e cobrir com Solução de Safranina 0,5% aquosa por 30 segundos.
- Lavar em água corrente e secar com lenço de papel ou papel de filtro (sem esfregar, apenas tocando o esfregaço com o papel). Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão. Os esporos vão ficar corados de verde e as células vegetativas de vermelho.

e.3) Coloração de esporos (Método de Ashby). Preparar um esfregaço da cultura, da mesma forma indicada para a coloração de Gram. Corar da seguinte forma:

- Segurar a lâmina sobre um banho ou frasco com água sob fervura, até observar gotas de água condensada na parte de baixo da lâmina.
- Cobrir o esfregaço com Solução de Verde Malaquita 5% aquosa e corar durante um a dois minutos.
- Lavar em água corrente e cobrir com Solução de Safranina 0,5% aquosa por 20 a 30 segundos.
- Lavar em água corrente e secar com papel de filtro. Observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão. Os esporos vão ficar corados de verde e as células vegetativas de vermelho.

e.4) Montagens úmidas para observação microscópica a fresco. Se a cultura estiver em meio sólido, colocar uma gota de solução salina sobre uma lâmina de vidro limpa e seca e emulsionar uma alçada da cultura com a solução salina. Se a cultura estiver em caldo,

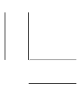
agitar o caldo e colocar uma alçada sobre a lâmina de vidro. Cobrir o líquido com uma lamínula e observar imediatamente ao microscópio, antes que o material seque. A melhor visualização é obtida em microscópio de contraste de fase, mas, na falta deste, também pode ser feita em microscópio óptico, com objetiva de imersão. A observação a fresco permite verificar a motilidade, a forma e o arranjo das células.

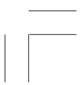
5.4. REFERÊNCIAS

BIER, J.W., SPLITTSTOESSER, D.F., TORTORELLO, M.L. Microscopic methods. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 4, p.37-44.

SILVA, N. *Testes Bioqúimicos para Identificação de Bactérias em Alimentos.* Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996.

SPERBER, W.A., MOORMAN, M.A. & FREIER, T.A. Cultural methods for the enrichment and isolation of microrganisms. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 5, p.45-51.



Capítulo 6

Contagem Total de Aeróbios Mesófilos e Psicrotróficos em Placas

6.1. INTRODUÇÃO

A maioria das orientações desse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001). Quando diferentes ou complementares às do *Compendium*, foram também incluídas recomendações da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004) e da 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater* (Eaton *et al.*, 2005).

Significado da contagem total de aeróbios mesófilos

A contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas, (Aerobic Plate Count), também denominada Contagem Padrão em Placas, é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Não diferencia tipos de bactéria, sendo utilizado para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira.

Não é um indicador de segurança, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas. Dependendo da situação, pode ser útil na avaliação da qualidade, porque populações altas de bactérias podem indicar deficiências na sanitização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes. Os produtos fermentados, ao contrário, apresentam populações naturalmente altas de mesófilos, sem qualquer relação com a qualidade.

A utilização da contagem total de aeróbios mesófilos como indicador de qualidade deve ser criteriosa. Por exemplo, aplicada à ingredientes, deve levar em conta a diluição e o efeito no produto final. Aplicada a alimentos desidratados, pode indicar se o controle da umidade está sendo corretamente aplicado ao processo de secagem. Nas Tabela 6.1 são apresentadas as contagens típicas em algumas mercadorias no comércio internacional. Na Tabela 6.2 as especificações da FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) para a contagem total de aeróbios mesófilos em alguns alimentos. Na Tabela 6.3 as especificações apresentadas pelo *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* da APHA para a contagem total de aeróbios mesófilos em produtos lácteos.

Tabela 6.1. Contagem total de aeróbios mesófilos típica em mercadorias no comércio internacional (Morton, 2001).

Produto	Contagem total de aeróbios mesófilos máxima (UFC/g)
Arroz não beneficiado	$1{,}8x10^6$
Arroz beneficiado	$1{,}4x10^3$
Amêndoas	$3{,}0$ a $7{,}0x10^5$
Nozes	$3{,}1x10^4$ a $2{,}0x10^6$
Massas frescas refrigeradas ou congeladas	$1{,}0x10^2$ a $1{,}0x10^6$
Pães, bolos, doces e salgados assados	$1{,}0x10^1$ a $1{,}0x10^3$
Proteína de soja	$1{,}0x10^2$ a $1{,}0x10^5$
Massas	$1{,}0x10^3$ a $1{,}0x10^5$
Misturas de cereais secos	$1{,}0x10^3$ a $1{,}0x10^5$
Cereias matinais	0 a $1{,}0x10^2$
Cacau	$1{,}0x10^4$
Vegetais congelados	$1{,}0x10^3$ a $1{,}0x10^6$
Leite cru	$8{,}0x10^2$ a $6{,}3x10^5$
Saladas mistas (frango, ovos, batatas, camarões)	$1{,}0x10^4$ a $1{,}0x10^5$
Carne moída fresca	$1{,}0x10^5$
Cortes de frango	$1{,}0x10^5$
Batatas congeladas	$1{,}0x10^3$ a $1{,}0x10^5$

Tabela 6.2. Especificações da FAO/WHO para contagem total de aeróbios mesófilos em alimentos (Morton, 2001).

Produto	Contagem total de aeróbios mesófilos máxima (UFC/g)
Ovo integral em pó ou congelado	$5{,}0x10^4$
Produtos instantâneos em pó	$1{,}0x10^3$
Produtos desidratados consumidos após adição de líquido com emprego de calor	$1{,}0x10^4$
Camarão congelado pré cozido	$1{,}0x10^5$
Misturas geladas	$2{,}5x10^4$
Gelo comestível	$5{,}0x10^4$
Leite em pó	$5{,}0x10^4$
Caseínas	$3{,}0x10^4$

FAO = Food and Agriculture Organization, WHO = World Health Organization (Organização Mundial da Saúde - OMS).

Tabela 6.3. Especificações apresentadas pelo *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* da APHA para a contagem total de aeróbios mesófilos em produtos lácteos (Lewis *et al.*, 2004).

Produto	Contagem total de aeróbios mesófilos máxima (UFC/g ou ml)
Leite e produtos lácteos pasteurizados	$2{,}0x10^4$
Leite condensado	$3{,}0x10^4$
Leite desnatado em pó tipo A e tipo Instantâneo	$3{,}0x10^4$
Leite desnatado em pó tipo Extra	$4{,}0x10^4$
Leite desnatado em pó tipo Padrão	$7{,}5x10^4$
Leite integral em pó tipo Extra	$3{,}0x10^4$
Leite integral em pó tipo Padrão	$5{,}0x10^4$

APHA = American Public Health Association.

Definição de psicrotróficos

Microrganismos que crescem em alimentos sob refrigeração (0-7°C) mas apresentam temperatura ótima acima de 20°C são chamados de psicrotróficos ou psicrotrófilos. São definidos como microrganismos capazes de produzir crescimento visível a 7±1°C no prazo de 7 a 10 dias, independente de sua temperatura ótima. Na classificação tradicional dos microrganismos em função da temperatura – termófilos, mesófilos e psicrófilos - os psicrotróficos são um subgrupo dos mesófilos, não dos psicrófilos, porque esses últimos geralmente morrem à temperatura ambiente. Os psicrotróficos, ao contrário, se multiplicam em alimentos refrigerados mas crescem melhor nas temperaturas da faixa mesófila.

As principais bactérias psicrotróficas estão distribuídas em vários gêneros, incluindo, cocos e bastonetes, esporogênicos e não esporogênicos, aeróbios e anaeróbios. As mais comuns em alimentos (produtos lácteos, cárneos, aves, peixes e frutos do mar) são espécies dos gêneros *Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Brochothrix, Carnobacterium, Chromobacterium, Citrobacter, Clostridium, Corynebacterium, Enterobacter, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Leuconostoc, Listeria, Microbacterium, Micrococcus, Moraxella, Pseudomonas, Psychrobacter, Serratia, Shewanella, Streptococcus* e *Weissella.*

Espécies de *Alteromonas, Photobacterium* e *Vibrio* são importantes deteriorantes de pescados.

Espécies de *Bacillus, Clostridium, Enterobacter, Flavobacterium, Pseudomonas* e *Yersinia* causam amolecimento e deterioração em vegetais refrigerados.

Brochothrix, Lactobacillus, Leuconostoc e membros da família *Enterobacteriaceae* são deteriorantes de alimentos embalados sob vácuo ou atmosferas modificadas, bem como *Carnobacterium* e *Weissella viridescens*, em menor extensão.

Pseudomonas, Flavobacterium, Alcaligenes, Acinetobacter, Klebsiella, Bacillus e *Lactobacillus* são deteriorantes de produtos lácteos, *Pseudomonas* sendo a mais freqüente.

Algumas bactérias patogênicas também são psicrotróficas, incluindo *Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Aeromonas hydrophila, Vibrio cholerae*, algumas cepas de *E. coli* enteropatogênica, algumas cepas de *Bacillus cereus*, algumas cepas de *Clostridium botulinum* tipo E e tipos B e F não proteolíticos.

Métodos de análise

O método clássico de contagem total de aeróbios mesófilos ou psicrotróficos em alimentos, descrito no Capítulo 7 do *Compendium*, é a contagem padrão em placas (plaqueamento em profundidade, superfície ou filtração em membrana). O meio de cultivo recomendado para a maioria dos ensaios é o Ágar Padrão para Contagem (PCA), incubado a 35±1°C/48±2h, com as seguintes exceções:

Na análise de leite e produtos lácteos, o Capítulo 6 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Laird *et al.*, 2004) recomenda incubar o PCA a 32±1°C/48±2h, prolongando a incubação até 72±3h, no caso de produtos lácteos desidratados.

Na análise de sucos de frutas, o Capítulo 58 do *Compendium* (Hatcher *et al.*, 2001) recomenda substituir o PCA pelo Ágar Soro de Laranja (OSA), incubado a 30±1°C/48±2h. O OSA é um meio nutricionalmente mais rico que o PCA, permitindo recuperar as bactérias lácticas, normalmente presentes nesses produtos.

Na análise de água, a Seção 9215 do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) recomenda substituir o PCA pelo Ágar R2A ou NWRI, incubados a 35±0,5°C/48±2h. Esses meios podem ser usados no plaqueamento em profundidade, superfície e filtração em membrana. Recomenda ainda, exclusivamente para a técnica de filtração em membrana, o Ágar m-HPC, incubado a 35±0,5°C/48±2h. Em água o PCA resulta em contagens menores do que

o R2A ou o NWRI, mas foi mantido na 21º edição do *Standard Methods*, para estudos comparativos com outros meios e para laboratórios que necessitam manter a continuidade de registros antigos.

Outros métodos que já foram oficializados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005) são os "kits" analíticos descritos na Tabela 6.4.

Tabela 6.4. "Kits" analíticos oficializados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005) para contagem total de aeróbios em alimentos.

Fabricante	Nome do "kit"	Validação AOAC	Aplicação
3M Microbiology Products	Petrifilm Aerobic Count Plate	AOAC Official Methods 990.12, 989.10, 986.33	Alimentos, produtos lácteos, leite
3M Microbiology Products	Redigel Aerobic Plate Count	AOAC Official Method 988.18	Produtos lácteos e não lácteos
BioControl Systems, Inc.	SimPlate for Total Plate Count Color Indicator (TPC-CI)	AOAC Official Method 2002.07	Alimentos, ingredientes e amostras ambientais

Fonte: AOAC International, disponível no site <http://www.aoac.org/testkits/kits-microbiology.htm>, acesso em 10/02/06.

6.2. MÉTODO DE CONTAGEM TOTAL DE AERÓBIOS MESÓFILOS EM PLACAS

Método da American Public Health Association (APHA) para a análise de alimentos, descrito no Capítulo 7 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Morton, 2001). Incluídas também as recomendações específicas do Capítulo 58 do *Compendium* (Hatcher *et al.*, 2001) para a análise de sucos de frutas, as do Capítulo 6 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Laird *et al.*, 2004) para a análise de produtos lácteos, e as da Seção 9215 do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005), para a análise de água. Aplicação: análise de água e de todos os alimentos.

A contagem pode ser feita utilizando-se os métodos de plaqueamento em profundidade (pour plate), superfície (spread plate) e filtração em membrana. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

6.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml
- Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Inoculação por plaqueamento em profundidade

- Placas de Petri de 20 x 100mm estéreis vazias
- Ágar Padrão para Contagem (PCA)
- Ágar Soro de Laranja (OSA) (para sucos de frutas)
- Ágar R2A ou NWRI (preferenciais para amostras de água)

Inoculação por plaqueamento em superfície

- Placas com Ágar Padrão para Contagem (PCA)
- Placas com Ágar Soro de Laranja (OSA) (para sucos de frutas)
- Placas com Ágar R2A ou NWRI (para amostras de água)
- Alça de espalhamento (alça de Drigalski) mergulhada em etanol 70%

Inoculação por filtração em membrana

- Placas com Ágar Padrão para Contagem (PCA)
- Placas com Ágar R2A, NWRI ou m-HPC (para amostras de água)
- Membranas de 47mm de diâmetro, porosidade de 0,45µm, brancas e quadriculadas
- Conjunto de filtração previamente esterilizado
- Bomba de vácuo
- Pinças para transferência das membranas, mergulhadas em etanol
- Proveta de 100 ou 200ml estéril, para medição de volumes de amostra

Incubação

- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado (para alimentos em geral)
- Estufa incubadora regulada a 30±1°C com termômetro calibrado (para sucos de frutas)
- Estufa incubadora regulada a 32±1°C com termômetro calibrado (para leite e produtos lácteos)

6.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos em placas encontra-se descrito na Figura 6.1.

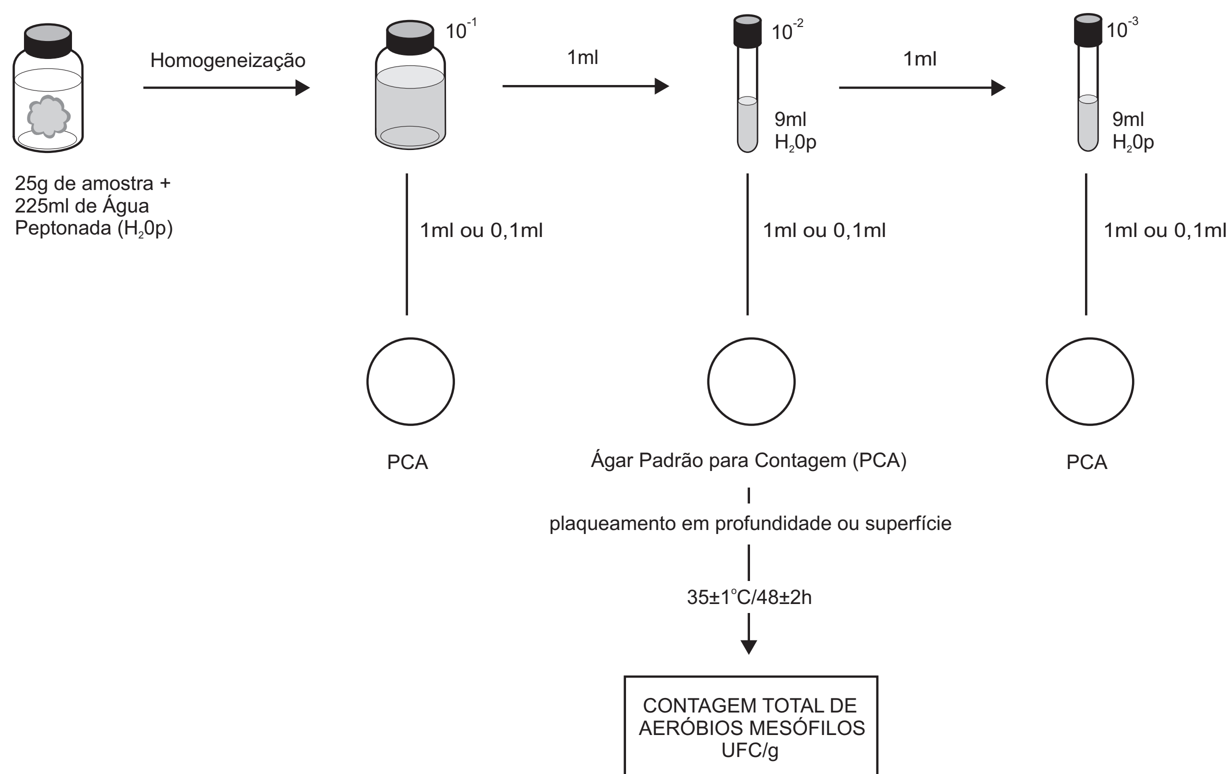


Figura 6.1. Esquema geral de análise para contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos em placas (Morton, 2001).

6.2.2.1. Plaqueamento em profundidade

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular 1ml de cada diluição em placas de Petri separadas, estéreis e vazias.

c) Adição do meio de cultura. Verter nas placas inoculadas, 12 a 15ml de Ágar Padrão para Contagem (PCA), previamente fundido e resfriado a 44-46°C. Para amostras de sucos de frutas, substituir o PCA pelo Ágar Soro de Laranja (OSA). Para amostras de água, preferencialmente, substituir o PCA pelo Ágar R2A ou NWRI. Misturar o inóculo com o meio de cultura movimentando suavemente as placas, numa superfície plana, em movimentos na forma de oito ou em movimentos circulares, oito a dez vezes no sentido horário e oito a dez vezes no sentido anti-horário. Distribuir as placas numa bancada fria, sem empilhar, para solidificação do meio. Para amostras em que seja comum a ocorrência de colônias grandes e espalhadas (leite em pó, por exemplo), aguardar a completa solidificação do ágar e adicionar uma sobrecamada do mesmo meio.

d) Incubação. Inverter e incubar as placas nas seguintes condições:

PCA - 35±1°C/48±2h para alimentos em geral
PCA - 32±1°C/48±2h para produtos lácteos
PCA - 32±1°C/72±3h para produtos lácteos desidratados
OSA - 30±1°C/48±2h para sucos de frutas
R2A e NWRI - 35±0,5°C/48±2h para água

e) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Selecionar as placas com 25 a 250 colônias e contar as colônias com o auxílio de uma lupa, em um contador de colônias. Calcular o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro da amostra multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada. Caso tenham sido utilizadas duas placas por diluição (duplicata), considerar como número de colônias a média aritmética da contagem obtida em cada uma das placas da duplicata. Usar notação exponencial e apenas uma casa decimal depois da vírgula, na apresentação dos resultados. Para a contagem de colônias e cálculo dos resultados em situações não usuais, seguir as orientações do Capítulo 3.

Limite de detecção do procedimento padrão (1ml/diluição): 1 UFC/ml de amostras líquidas ou 10 UFC/g de amostras sólidas.

6.2.2.2. Plaqueamento em superfície

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Preparação das placas. Preparar previamente placas de Ágar Padrão para Contagem (PCA) e, antes do uso, secar em capela de fluxo laminar (30 a 60 minutos, com as tampas parcialmente abertas) ou em estufa (50°C/1,5-2h ou 25-30°C/18-24h). Para amostras de sucos de frutas, substituir o PCA pelo Ágar Soro de Laranja (OSA). Para amostras de água, preferencialmente, substituir o PCA pelo Ágar R2A ou NWRI.

c) Inoculação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular 0,1ml de cada diluição na superfície das placas previamente preparadas. Usando uma alça de Drigalski, espalhar o inóculo por toda a superfície do meio, até que o excesso de líquido seja absorvido. Se o nível de contaminação esperado da amostra for baixo, inocular um volume maior (1 ml) da primeira diluição, distribuindo esse volume por quatro placas (três placas com 0,3ml e uma placa com 0,1ml).

d) Incubação. Aguardar que as placas sequem (mínimo 15min), inverter e incubar nas seguintes condições:

PCA - 35±1°C/48±2h para alimentos em geral
PCA - 32±1°C/48±2h para produtos lácteos
PCA - 32±1°C/72±3h para produtos lácteos desidratados
OSA - 30±1°C/48±2h para sucos de frutas
R2A e NWRI - 35±0,5°C/48±2h para água

e) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Seguir as mesmas orientações descritas para o plaqueamento em profundidade, porém, multiplicar o resultado por dez, para levar em conta o volume dez vezes menor inoculado. Se foi feita a distribuição de 1ml da primeira diluição em quatro placas, o número de colônias dessa diluição é a soma das quatro placas. Se o cálculo do resultado for feito com a contagem dessa diluição, então não é necessário multiplicar por dez. Para a contagem de colônias e cálculo dos resultados em situações não usuais, seguir as orientações do Capítulo 3.

Limite de detecção do procedimento padrão (0,1ml/diluição): 10 UFC/ml de amostras líquidas ou 100 UFC/g de amostras sólidas.

6.2.2.3. Filtração em membrana

O método de filtração em membrana aplica-se a líquidos límpidos, sem sólidos em suspensão. É recomendado para amostras com contagens abaixo do limite de detecção dos outros métodos, sendo bastante utilizado na análise de refrigerantes (não contendo sucos naturais) e água para consumo humano. Pode também ser utilizado na análise de produtos sólidos convertidos em soluções límpidas, como sal e açúcar, por exemplo.

a) Preparação do conjunto de filtração. Seguir as orientações do Capítulo 3.

b) Preparação das placas. Preparar previamente, da mesma forma recomendada para o plaqueamento em superfície. Para amostras de água, preferencialmente, substituir o PCA pelo Ágar R2A, NWRI ou m-HPC. Podem também ser utilizadas placas de 50mm de diâmetro (com 5ml de meio de cultura) ou almofadas absorventes ("pads") estéreis, colocados no interior de placas (também estéreis) e embebidos com porções de 2ml dos mesmos meios, na forma líquida.

c) Preparação da amostra. Homogeneizar a amostra seguindo as orientações do Capítulo 2. Medir 100ml numa proveta estéril e verter cuidadosamente no copo do conjunto de filtração, evitando respingos. Se o copo do conjunto de filtração for graduado e a escala contiver a marcação de volume requerida, o volume da amostra pode ser medido diretamente, sem a utilização da proveta.

Nota c.1) Como o método de filtração é uma técnica de concentração dos microrganismos em amostras com baixas contagens, o procedimento usual é a filtração de 100ml da

amostra, que podem ser fracionados em duas porções de 50ml, quatro porções de 25ml ou três porções de 70, 25 e 5ml, respectivamente. A seleção do volume a ser filtrado, entretanto, depende da contaminação estimada na amostra, de forma a resultar em placas com contagens na faixa de 20 a 200 colônias.

Nota c2) Quando o volume a ser filtrado for menor do que 20ml, adicionar ao copo do conjunto de filtração cerca de 20-30ml de diluente, antes da adição da amostra. Não é necessária uma medida exata de diluente, cuja função é aumentar o volume a ser filtrado, facilitando uma melhor distribuição dos microrganismos na membrana.

d) Filtração. Ligar a bomba de vácuo e proceder à filtração. Após a passagem da amostra, ainda com a bomba ligada, enxaguar as paredes do copo com 20 a 30ml de diluente, para recolher eventuais contaminantes aderidos. Repetir esse procedimento mais uma vez. Desligar a bomba de vácuo antes que a membrana seque excessivamente.

e) Transferência e incubação da membrana. Retirar o copo e, com uma pinça flambada e resfriada, transferir a membrana para a placa com o meio de cultura, com a face quadriculada para cima. Ao colocar a membrana na placa é importante que toda a superfície fique completamente aderida ao meio, para que haja contato dos microrganismos com os nutrientes. Se houver formação de bolhas, deve-se levantar a borda da membrana mais próxima da(s) bolha(s) e recolocá-la de forma a eliminar a(s) bolha(s).

f) Incubação. Incubar as placas nas condições abaixo, invertidas e, preferencialmente, acondicionadas em sacos ou bandejas com papel toalha ou papel de filtro úmido, para evitar desidratação.

PCA - 35±1°C/48±2h para alimentos em geral
R2A, NWRI ou m-HPC - 35±0,5°C/48±2h para água

g) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Proceder à contagem das colônias com o auxílio de um microscópio estereoscópico, com aumento de 10 a 15 vezes e, para facilitar a visualização posicionar as placas de forma a obter uma iluminação perpendicular ao plano da membrana. Selecionar para contagem placas com 20 a 200 colônias. Seguir as orientações abaixo para contagem e cálculo do número de UFC/ml:

Se o número de colônias por quadrícula da membrana for menor ou igual a dois, contar todas as colônias presentes e dividir pelo volume filtrado, para obter o número de UFC/ml.

Se o número de colônias por quadrícula estiver na faixa de três a dez, contar dez quadrículas e tirar a média por quadrícula. Multiplicar esse valor por 100 e dividir pelo volume filtrado, para obter o número de UFC/ml. Se o número de colônias por quadrícula estiver na faixa de dez a vinte, contar apenas cinco quadrículas para tirar a média e calcular o número de UFC/ml da mesma forma.

Se o número de colônias por quadrícula for maior do que vinte, expressar o resultado como maior do que $2,0x10^3$ dividido pelo volume filtrado.

Limite de detecção do procedimento padrão (filtração de 100ml): 1 UFC/100ml.

6.3. MÉTODO DE CONTAGEM TOTAL DE AERÓBIOS MESÓFILOS EM PETRIFILM™ (AOAC 990.12/989.10/986.33)

Petrifilm™ é uma modificação da contagem de células viáveis em placas. É composto por dois filmes estéreis, reidratáveis, impregnados por substâncias geleificantes solúveis em água fria, pelo meio de cultura (similar ao Ágar Padrão para Contagem - PCA) e por um indicador de tetrazólio (torna as colônias vermelhas, facilitando a contagem).

Método oficial da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), incluído no Capítulo 7 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Morton, 2001) e no Capítulo 6 da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Laird *et al.*, 2004). Aplica-se à análise de todos os alimentos.

6.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml
- Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Inoculação

- Placas de Petrifilm™AC para Contagem Total (3M Company)
- Espalhador

Incubação

- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 32±1°C com termômetro calibrado (para leite e produtos lácteos)

6.3.2. PROCEDIMENTO

Observação. O procedimento abaixo é orientativo, devendo sempre ser verificadas e obedecidas as instruções do fabricante.

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Posicionar os petrifilms em uma superfície plana. Selecionar três diluições adequadas da amostra para a inoculação. Inocular 1ml de cada diluição em placas de Petrifilm™AC para Contagem Total (3M Company) separadas, levantando o filme superior e depositando o inóculo no centro da área circular do filme inferior. Baixar o filme superior sobre o inóculo, posicionar o espalhador (que acompanha o kit de petrifilms) e, seguindo as instruções do fabricante, aplicar uma leve pressão, para espalhar o inóculo.

c) Incubação: Aguardar um minuto para o gel solidificar e incubar 35±1°C/48±2h, em pilhas de não mais de 20 filmes, sem inverter. No caso de produtos lácteos, incubar a 32±1°C/48±3h

d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. A área circular de crescimento do petrifilm tem aproximadamente 20cm^2 e a contagem deve ser feita nos petrifilms com 25 a 250 colônias. Contar todas as colônias vermelhas, independente do tamanho ou intensidade da cor. Calcular o número

de UFC por grama ou mililitro da amostra multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição. Para determinar o número de colônias em petrifilms com mais 250, contar as colônias em um ou mais quadrados de $1cm^2$, calcular a média por cm^2 e multiplicar por 20.

Limite de detecção: 1 UFC/ml de amostras líquidas ou 10 UFC/g de amostras sólidas.

6.4. MÉTODO DE CONTAGEM DE AERÓBIOS PSICROTRÓFICOS

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 13 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Cousin *et al.*, 2001) e no Capítulo 8 da 17º Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004). Aplica-se à análise de todos os alimentos.

O *Compendium* recomenda que as amostras destinadas à contagem de aeróbios psicrotróficos sejam analisadas no intervalo de seis horas, a partir da coleta. A estocagem refrigerada permite sua multiplicação e o tempo de geração de vários desses microrganismos encontra-se dentro desse intervalo. O congelamento não é indicado para essas amostras, porque pode provocar injúria ou morte de vários microrganismos. Se o congelamento for indispensável, considerar na avaliação dos resultados que parte da microbiota pode ter sido perdida.

6.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1ml
- Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Inoculação por plaqueamento em superfície

- Meio de cultura: placas com Ágar Padrão para Contagem (PCA), que pode ser substituído pelo Ágar Tripticase de Soja (TSA) ou pelo Petrifilm Contagem Total (3M Company)
- Alça de espalhamento (alça de Drigalski) mergulhada em etanol 70%
- Estufa incubadora regulada a 7±1°C com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 17±1°C com termômetro calibrado (opcional)

6.4.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem total de microrganismos aeróbios psicrotróficos em placas encontra-se descrito na Figura 6.2.

Segue o mesmo procedimento da contagem total de aeróbios mesófilos, alterando a condição de incubação.

O Capítulo 13 do *Compendium* (Cousin *et al.*, 2001) recomenda plaqueamento em Petrifilm ou plaqueamento em superfície, usando Ágar Padrão para Contagem (PCA) ou Ágar Tripticase de Soja (TSA) como meios de cultivo. Não recomenda o plaqueamento em profundidade porque as bactérias são sensíveis ao calor e podem ser afetadas pelo meio de cultura quente. A incubação pode ser feita a 7±1°C por 10 dias ou 17±1°C por 16 horas, seguido de mais 3 dias a 7±1°C.

O *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004) recomenda, para leite e produtos lácteos, plaqueamento em profundidade, usando PCA resfriado a 45±1°C, antes da adição sobre o inóculo. Incubação a 7±1°C por 10 dias.

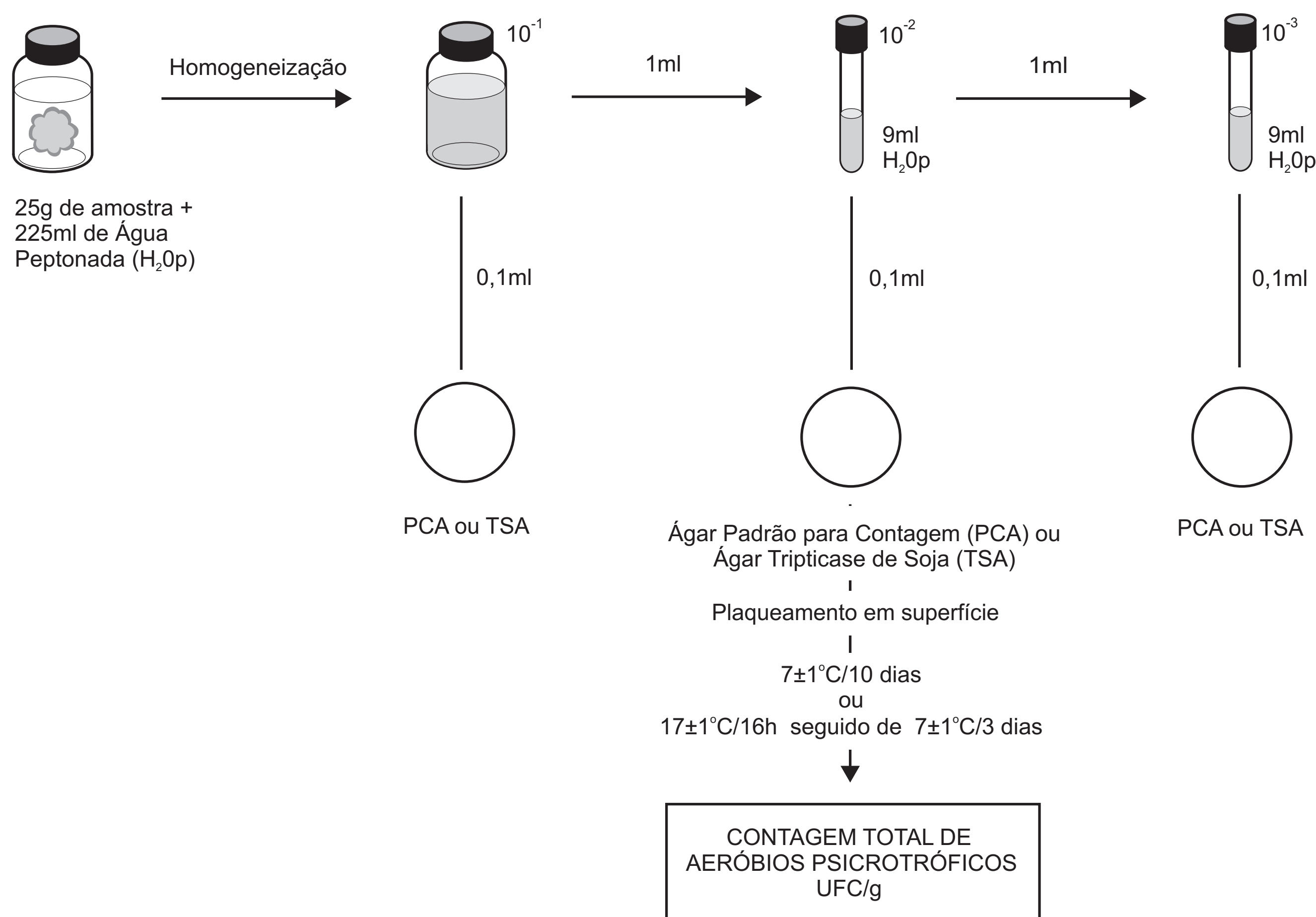


Figura 6.2. Esquema geral de análise para contagem total de microrganismos aeróbios psicrotróficos em placas (Cousin *et al.*, 2001).

6.5. REFERÊNCIAS

AOAC International, 2005. Rapid Test Kits. Disponível no site <http://www.aoac.org/testkits/kits-microbiology.htm>, acesso em 10/02/06.

COUSIN, M.A., JAY, J.M. & VASAVADA, P.C. Psychrotrophic microrganisms. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 13, p.159-166.

DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W. & GREENBERG, A.E. (Eds). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005.

FRANK, J.F. & YOUSEF, A.E. Tests for groups of microrganisms. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 8, p.227-248.

HATCHER, W.S., PARISH, M.E., WEIHE, J.L., SPLITTSTOESSER, D.F. & WOODWARD, B.B. Fruit beverages. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 58, p.565-568.

HUNT, M.E. & RICE, E.W. Microbiological examination. In: EATON *et al.* (Eds), *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000, Section 9215, p.9.34-9.36.

LAIRD, D.T., GAMBREL-LENARZ, S.A., SCHER, F.M. *et al.* Microbiological count methods. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 6, p.153-186.

LEWIS, D., SPOMER, D., SMITH, M., CLARK, W. Milk and milk products standards. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 16, p.537-550.

MORTON. R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C, 2001. Chapter 7, p.63-67.

WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004.

Capítulo 7

Contagem de Bolores e Leveduras

7.1. INTRODUÇÃO

A maioria das informações e orientações contidas nesse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001) e da 3ª Edição do livro *Fungi and Food Spoilage* (Pitt & Hocking, 2009). Quando diferentes ou complementares às do *Compendium*, foram também incluídas recomendações da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004), específicas para a análise de produtos lácteos.

Os bolores e leveduras constituem um grande grupo de microrganismos, a maioria originária do solo ou do ar. Os bolores são extremamente versáteis, a maioria das espécies capaz de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos. A maioria também é indiferente com relação às fontes de nitrogênio, podendo utilizar o nitrato, os íons de amônia e o nitrogênio orgânico. Entretanto, se for necessário utilizar proteínas ou aminoácidos como fonte de nitrogênio ou de carbono, várias espécies vão apresentar um crescimento limitado. As leveduras, de maneira geral, são mais exigentes do que os bolores. Muitas são incapazes de assimilar nitrato e carboidratos complexos, algumas exigem vitaminas e outras, como *Zygosaccharomyces bailii*, por exemplo, não conseguem utilizar a sacarose como única fonte de carbono. Esses fatores, de uma certa forma, limitam a gama de alimentos susceptíveis à deterioração por leveduras.

Os bolores e leveduras são também bastante resistentes à condições adversas, como pH ácido e atividade de água baixa. Com relação ao pH, os fungos são muito pouco afetados pela variação na faixa de 3,0 a 8,0. Vários bolores crescem abaixo de 2,0 e diversas leveduras abaixo de 1,5. Entretanto, quando o pH afasta-se do ótimo (geralmente próximo de 5,0) a velocidade de crescimento diminui e, se houver outros fatores de inibição (atividade de água, temperatura, etc.), seu efeito restritivo sobre a velocidade de crescimento torna-se mais acentuado.

A temperatura ótima de crescimento da maioria dos fungos encontra-se na faixa de 25 a 28°C, não crescendo bem nas temperaturas mesófilas (35-37°C) e raramente nas temperaturas de bactérias termotolerantes (45°C). Seu crescimento não é incomum sob condições de refrigeração (5°C), porém, abaixo de 10°C negativos os alimentos podem ser considerados microbiologicamente estáveis.

Os bolores deteriorantes de alimentos, como quase todos os outros fungos filamentosos, exigem oxigênio para crescimento, podendo ser considerados aeróbios estritos. No entanto, várias espécies, são eficientes em utilizar pequenas quantidades de oxigênio, de forma que o efeito do O_2 é dependente da quantidade absoluta dissolvida no substrato, e não da concentração pre-

sente na atmosfera. Ao contrário dos bolores, muitas espécies de leveduras são capazes de crescer na completa ausência de O_2 e em diferentes concentrações de CO_2. Isso as torna os deteriorantes mais comuns de alimentos líquidos engarrafados, nos quais o crescimento dos bolores é limitado pela disponibilidade de oxigênio. Eventualmente, algumas espécies de bolores dos gêneros *Mucor, Rhizopus, Byssochlamys* e *Fusarium* podem crescer nesses produtos, provocando deterioração.

A consistência do alimento, assim como a atmosfera de armazenamento, exerce uma considerável influência sobre os tipos de fungos que irão provocar a deterioração do produto. Em linhas gerais, as leveduras predominam em alimentos líquidos, porque são unicelulares e se dispersam mais facilmente em líquidos. Além disso, substratos líquidos oferecem maior oportunidade para desenvolvimento de condições anaeróbias, ideais para as leveduras fermentativas. Os bolores, ao contrário, são favorecidos por substratos sólidos firmes, em cuja superfície há fácil acesso ao oxigênio. Por outro lado, essa afirmação não deve ser entendida como absoluta, sugerindo que leveduras não possam deteriorar alimentos sólidos ou bolores alimentos líquidos. Simplesmente, as leveduras são mais competitivas em líquidos, provocando alterações percebidas mais fácil ou rapidamente.

Os fungos infecciosos raramente são associados aos alimentos, porém, certas leveduras de origem alimentar podem desencadear reações alérgicas e alguns bolores podem provocar infecções em indivíduos imunodeprimidos. Vários bolores produzem micotoxinas, que são metabólitos tóxicos formados durante o crescimento. Os gêneros de bolores toxigênicos mais importantes são *Aspergillus, Penicillium* e *Fusarium.*

Métodos de análise de bolores e leveduras totais

A quantificação de bolores e leveduras em alimentos é feita pelo método de contagem padrão em placas, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC). O método mais recomendado é o plaqueamento em superfície, para aumentar a exposição ao oxigênio e evitar o "stress" causado pelo meio de cultura quente. Vários meios podem ser utilizados:

O Capítulo 20 do *Compendium* (Beuchat & Cousin, 2001) recomenda o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), para alimentos com atividade de água superior a 0,95 e o Ágar Dicloran Glicerol 18 (DG18), para alimentos de atividade de água menor ou igual a 0,95. O DRBC contém cloranfenicol, para inibir bactérias, além de dicloran e rosa de bengala, para restringir o espalhamento da colônia. O DG18, além de cloranfenicol e dicloran, contém também glicerol, que reduz a atividade de água do meio.

O Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004) recomenda o DRBC para produtos lácteos em geral e o Ágar Extrato de Levedura Glicose Cloranfenicol (YEGC) para amostras com predomínio de leveduras ou com leveduras injuriadas pelo processamento. Nesses produtos o DRBC recupera menos leveduras do que o YEGC. Para produtos não submetidos a tratamento térmico, acidificação ou outro tratamento que possa provocar injúrias às células, pode também ser utilizado Ágar Batata Dextrose Acidificado (PDA-AC), porém, algumas bactérias podem crescer neste meio (Taniwaki *et al.*, 1999).

Outros métodos já oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) são os "kits" analíticos descritos na Tabela 7.1.

Tabela 7.1. "Kits" analíticos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a contagem bolores e leveduras em alimentos.

Fabricante	Nome do "kit	Validação	Aplicação
3M Microbiology Products	Petrifilm Yeast and Mold Count Plate	AOAC Official Method 997.02	Alimentos
BioControl Systems Inc.	SimPlate Yeast and Mold Color Indicator (YM-CI)	AOAC Official Method 2002.11	Alimentos, ingredientes e amostras ambientais

Fonte: AOAC, 2009. Rapid Methods Adopted as AOAC Official Methods. Disponível no site <http://www.aoac.org/vmeth/oma_testkits.pdf>, acesso em 08/02/2010.

Fungos psicrotróficos

Os bolores e leveduras também apresentam cepas psicrotróficas, embora sejam menos estudadas do que as bactérias. Os fungos predominam em alimentos refrigerados, com baixa atividade de água, alta acidez ou condições de embalagem que inibam bactérias, incluindo, frutas, geléias e produtos fermentados (iogurte, queijos, embutidos, etc.). Os gêneros de leveduras mais encontrados são *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Kluveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Trichosporon*. Os bolores são *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporotrichum*, *Thamnidium* e *Trichothecium*.

O método tradicional de quantificação de psicrotróficos em alimentos é contagem padrão em placas, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de aeróbios por grama ou mililitro. Os meios utilizados são o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), para alimentos em geral (pode ser substituído pelo PCA suplementado com 100mg/l de cloranfenicol) e o Ágar Dicloran Glicerol 18 (DG18), para alimentos com atividade de água menor que 0,95. A temperatura de incubação é de 7±1°C por 10 dias ou 17±1°C por 16 horas, seguido de mais 3 dias a 7±1°C.

Bolores termorresistentes

Os fungos, de maneira geral, apresentam baixa resistência ao calor, sendo destruídos com relativa facilidade por tratamentos térmicos brandos. Há, entretanto, exceções, pois certos fungos filamentosos produzem esporos capazes de sobreviver aos tratamentos térmicos. As espécies conhecidas são *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartoria fisheri*, *Talaromyces flavus*, *Talaromyces bacillisporus* e *Eupenicillium brefeldianum*, cujos esporos podem apresentar resistência térmica comparável à dos esporos bacterianos. Os esporos de *B. fulva* têm valor $D_{90°C}$ de um a 12 min (Bayne & Michener, 1979) e valor z entre 6 e 7ºC (King *et al.*, 1969). A resistência térmica de *B. nivea* é ligeiramente inferior, com $D_{88°C}$ de 0,75 a 0,8min e valor z entre 6 e 7ºC (Casella *et al.*, 1990) e a de *N. fischeri* é similar à de *B. fulva* (Splittstoesser & Splittstoesser, 1977).

Os bolores termorresistentes são mais comumente associados com a deterioração de frutas e seus derivados, processados termicamente. Sua sobrevivência ao tratamento térmico pode resultar em crescimento com formação de micélios e, no caso de *Byssochlamys*, na completa alteração da textura, devido à produção de pectinases.

Os bolores termorresistentes são amplamente distribuídos no solo, porém, o número de esporos em frutas geralmente é baixo, não excedendo 1-10/100g ou ml dos produtos processados. Ainda assim, na etapa imediatamente anterior ao tratamento térmico, a presença de apenas cinco esporos/g de produto já é considerada um problema sério. Em alimentos processados assepticamente em altas temperaturas por curto tempo (UHT ou HTST), sem adição de conservantes, mesmo contagens ainda mais baixas são inaceitáveis. Por essa razão, o sucesso da detecção depende da coleta de amostras significativamente maiores do que as normalmente requeridas nas demais análises de alimentos. Essas amostras podem ser congeladas antes da análise, porque os esporos não são afetados pelo congelamento.

A detecção é baseada no tratamento térmico das amostras, para eliminação das células vegetativas de bolores, leveduras e bactérias, seguido do plaqueamento em um meio adequado ao crescimento de bolores, como o Ágar Batata Dextrose (PDA) ou o Ágar Extrato de Malte (MEA).

Leveduras resistentes a conservantes

Algumas espécies de leveduras conhecidas como PRY (preservative resistant yeasts) são capazes de crescer na presença de conservantes, como o dióxido de enxofre e os ácidos sórbico, benzóico, propiônico e acético. A mais importante dentre essas espécies é *Zygosaccharomyces bailii,* mas *Zygosaccharomyces bisporus, Schizosacharomyces pombe*, *Cândida krusei* e *Pichia membranaefaciens* também podem crescer (Pitt & Hocking, 2009).

***Zigosaccharomyces bailii* (Lindner) Guilliermond 1912.** Dados levantados por Pitt & Hocking (2009) destacam *Zigosaccharomyces bailii* como a levedura mais conhecida e temida na indústria de alimentos ácidos. Em primeiro lugar, fermenta a glicose vigorosamente com produção de CO_2, não sendo inibida por pressões da ordem de 80 psig (560 kPa). Em segundo lugar, é resistente à maioria dos conservantes utilizados na prevenção de fungos, crescendo na presença de 400 a 800mg/kg ou mais de ácido benzóico ou sórbico. Em terceiro lugar, apresenta mecanismos de adaptação aos conservantes, podendo adquirir, após a primeira exposição, resistência a quantidades cada vez mais altas. Em quarto lugar, é xerofílica (cresce em atividades de água da ordem de 0,80 a 25°C e 0,86 a 30°C) e mesofílica (apresenta temperatura de crescimento na faixa de 5 a 40°C). Afortunadamente, apresenta baixa resistência térmica ($D_{50°C}$ = 0,1 a 0,3min para as células vegetativas e $D_{60°C}$ = 8 a 14min para os ascosporos), além de não utilizar a sacarose que, adicionada em lugar da glicose, pode prevenir a deterioração. O pH mínimo de crescimento é de 2,2-2,5.

Os produtos susceptíveis de deterioração fermentativa ou explosiva por *Z. bailii* incluem molhos de tomate, mostarda, azeitonas, maionese e outros molhos para saladas, refrescos e refrigerantes (carbonatados ou não), sucos de frutas (concentrados ou não), xaropes de frutas e outras coberturas, cidra, vinhos e vinagre balsâmico. A prevenção deve ser baseada na completa exclusão das células de *Z. bailii* do produto, porque a experiência mostra que a distribuição de apenas cinco células adaptadas por embalagem é suficiente para resultar na deterioração de uma alta porcentagem da produção. A alternativa mais segura é a pasteurização do produto na embalagem final, garantindo-se a manutenção de temperaturas de 65-68°C no centro da embalagem por vários segundos. Se a pasteurização for feita antes da distribuição do produto na embalagem, então é necessária a manutenção de um rigoroso programa de limpeza e sanificação das linhas de processamento, para prevenir a presença de focos de contaminação. A filtração em membrana antes da distribuição nas embalagens também pode ser uma alternativa eficiente, na impossibilidade da pasteurização. Sempre que possível, recomenda-se substituir a glicose pela sacarose e, nos produtos sintéticos, evitar a adição de sucos de frutas naturais e de fontes utilizáveis de carbono e nitrogênio.

Zygosaccharomyces bisporus **(Naganishi) Lodder & Kreger 1952.** Segundo Pitt & Hocking (2009), *Z. bisporus* apresenta características fisiológicas semelhantes às de *Z. bailii*, porém, é mais xerofílica (cresce em atividade de água de 0,70 em xarope de glicose/glicerol). Os ascosporos sobrevivem a 60ºC por 10min, mas não por 20min. Há poucos relatos sobre essa espécie na literatura e sua presença é menos comum em produtos deteriorados, embora apresente o mesmo potencial de deterioração de *Z. bailii*.

Schizosaccharomyces pombe **Lindner 1893.** *S. pombe* apresenta duas caracteríticas que a distinguem da maioria das demais leveduras deteriorantes de alimentos (Pitt & Hocking, 2009). Em primeiro lugar, a reprodução vegetativa não se dá por brotamento, mas sim por fissão lateral, e em segundo lugar, cresce melhor e mais rapidamente a 37 do que a 25ºC, o que a torna um deteriorante potencial em países tropicais. É osmofílica (cresce em atividade de água de 0,81 em meios a base de glicose), resistente aos conservantes (resiste a 120mg/kg de SO_2 livre e a 600mg/l de ácido benzóico) e apresenta resistência térmica dependente da atividade de água e do soluto presente, sendo maior na presença de sacarose (aw 0,95/$D_{65ºC}$ = 1,48min) do que na presença de glicose (aw 0,95/$D_{65ºC}$ = 0,41min), frutose (aw 0,95/$D_{65ºC}$ = 0,27min) ou glicerol (aw 0,95/$D_{65ºC}$ = 0,21min). É relativamente incomum como deteriorante, tendo sido isolada de xaropes de açúcar e licor de framboesa conservados com SO_2.

Candida krusei (Castellani) **Berkhout 1923.** Pitt & Hocking (2009) destacam, como principais características de *C.krusei:* a capacidade de crescer em pH extremamente baixo (1,3 a 1,9, dependendo do ácido presente), numa ampla faixa de temperatura (8 a 47ºC), com excelente desenvolvimento a 37ºC. Apresenta resistência aos conservantes, crescendo em 335ppm de ácido sórbico, 360ppm de ácido benzóico e 30ppm de SO_2 livre. Para células adaptadas ao ácido benzóico a concentração inibitória mínima (MIC) encontrada é de 13,5g/l de ácido acético, 8g/l de ácido propiônico, 440mg/l de ácido benzóico e 1g/l de metil paraben. Apresenta resistência térmica relativamente alta (sobrevive 80min a 56ºC), embora seja inativada com 2min a 65ºC. O tipo de deterioração mais comumente provocado em alimentos é a formação de filmes superficiais e tem sido isolada de sementes de cacau, figos, molhos de tomate, produtos cítricos, suco de laranja concentrado e outros produtos de frutas, refrescos, refrigerantes, azeitonas, queijos, iogurte e outros produtos fermentados de leite

Pichia membranaefaciens **Hansen 1904.** Pitt & Hocking (2009) destacam as seguintes características de *P. membranaefaciens*: produz ascosporos em forma de chapéu, cresce na faixa de 5 a 37ºC e é halofílica, podendo crescer em até 15,2% de NaCl (aw 0,90), dependendo do pH. Resistente a conservantes, seu crescimento já foi relatado em concentrações de benzoato de sódio que, dependendo do pH, variaram de 250mg/kg (pH 3,0) a 3000mg/kg (pH 4,5). Em pH 5,0 o crescimento já foi observado em 250mg/kg de sorbato, mas não em pH 3,0. O pH mínimo de crescimento varia de 1,9 a 2,2, dependendo do ácido presente. É muito sensível ao calor, resistindo por 30min a 56ºC ou 10min a 55ºC, mas não por 20min a 55 ou 10 minutos a 60ºC. Tem sido isolada da salmoura de azeitonas, onde provoca "stuck fermentation" (reduz a quantidade de carboidrato sem a consequente produção de ácido lático), de diversos produtos conservados em ácido acético (cebolas, pepinos, picles e chucrute), de molhos de tomate, de maionese e outros molhos para saladas, onde responde pela formação de filmes, de suco de laranja concentrado e outros produtos cítricos, de mosto de uva e de linhas de processamento de refrescos e refrigerantes.

A detecção de leveduras resistentes aos conservantes é baseada na inoculação em meios de cultura contendo ácido acético. Pitt & Hocking (2009) recomedam o Ágar Extrato de Malte com 0,5% de ácido acético (MAA) ou o Ágar (Caldo) Triptona Glicose Extrato de Levedura com 0,5%

de Ácido Acético (TGYA-TGYB). A inoculação no MAA ou TGYA é feita em superfície e as placas são incubadas a 30ºC por dois a três dias. O caldo TGYB é usado para enriquecimento prévio das amostras, quando a populações é muito baixa, aumentando a probabilidade de recuperação das cepas em MAA ou TGYA. O Capítulo 59 do *Compendium* (DiGiacomo & Gallagher, 2001) recomenda o Agar Leveduras Resistentes aos Conservantes (Preservative Resistant Yeast Medium - PRY), que contém 1% de ácido acético. O Capítulo 20 (Beuchat & Cousin, 2001), entretanto, recomenda os mesmos meios de Pitt & Hocking (2009).

Leveduras osmofílicas

De maneira geral as leveduras apresentam atividade de água mínima de crescimento na faixa de 0,88 e a maioria dos bolores na faixa de 0,80. Os bolores capazes de crescer em atividades de água abaixo do limite normal de 0,80 são chamados de xerófilicos (ou xerófilos), enquanto as leveduras que crescem abaixo do limite de 0,88 são comumente conhecidas como osmófilas ou osmofílicas (aquelas que crescem em altas concentrações de açúcar) ou halófilas (aquelas que crescem em altas concentrações de sal). Segundo Pitt & Hocking (2009), a maioria das leveduras osmofílicas são do gênero *Zygosaccharomyces*, incluindo *Z. rouxi, Z. bailii* e *Z. bisporus.*

***Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow.** Pitt & Hocking (2009) destacam as seguintes características de *Z. rouxii*: É extremamente resistente às baixas atividades de água, sendo considerada o 2º organismo mais xerofílico conhecido na natureza (o primeiro é outro fungo, o bolor *Xeromyces bisporus*). A atividade de água mínima relatada é 0,62 em xarope de frutose e 0,65 em xarope de glicose/glicerol, podendo crescer e produzir ascosporos em ameixas secas com aw 0,70. A temperatura ótima de crescimento varia de 24ºC (em 10% de glicose peso/peso) a cerca de 33ºC (em 60% de glicose peso/peso, atividade de água de 0,87). Dependendo da concentração de glicose, a temperatura mínima varia de 4ºC (em 10% de glicose) a 7ºC (em 60% de glicose) e a máxima varia de 37ºC (em 10% de glicose) a 42ºC (em 60% de glicose). Na presença de 46% de glicose, a faixa de pH de crescimento é de 1,8 a 8,0.

A resistência térmica de Z.rouxii varia com o substrato, sendo maior na presença de sacarose (aw 0,95/$D_{65°C}$ = 1,9min) do que na presença de glicose, frutose ou glicerol (aw 0,95/$D_{65°C}$ = 0,2-0,6min). A atividade de água exerce uma grande influência sobre a capacidade de sobrevivência ao calor, que aumenta com a redução do teor de água livre:

a_w	$D_{55°C}$	$D_{60°C}$	$D_{65,5°C}$	Z
0,995 a 0,998	< 0,1 min		< 0,1 min	
0,94	0,6 min	<0,1 min	< 0,1 min	
0,90	7 min		< 0,1 min	8ºC
0,85	55 min	10 min	0,4 min	8ºC

A combinação entre capacidade de crescer em atividades de água extremamente baixas e fermentar hexoses vigorosamente torna *Z. rouxii* a segunda levedura mais frequentemente associada à deterioração de alimentos processados, perdendo apenas para *Z. bailii.* Dentre os produtos de risco incluem-se caldo de cana, extrato de malte, sucos de frutas concentrados, coberturas e caldas carameladas, bombons com centro mole, frutas secas e xaropes de açúcar. A conservação não pode ser baseada exclusivamente na redução da atividade de água porque os produtos não podem ser concentrados a valores abaixo do seu mínimo de crescimento. Dessa forma, assim como ocorre com *Z. bailii*, a prevenção exige a completa exclusão de suas células do produto, sendo a pasteurização antes da concentração considerada a alternativa mais segura, além da refri-

geração por volta dos 0°C. Os conservantes são eficientes no controle do seu crescimento, mas raramente são permitidos em produtos concentrados. É essencial a manutenção de um rigoroso programa de limpeza e sanificação das linhas de processamento, porque *Z. rouxii* pode crescer continuamente nos equipamentos e sua presença no produto só será detectada depois de um período considerável de tempo.

A detecção de leveduras osmofílicas é baseada na inoculação em meios de cultura com alta concentração de glicose. A inoculação pode ser feita por plaqueamento em superfície ou filtração em membrana e as placas são incubadas a 30ºC por cinco a sete dias.

7.2. MÉTODO DE CONTAGEM TOTAL DE BOLORES E LEVEDURAS EM PLACAS

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 20 da 4o Edição do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Beuchat & Cousin, 2001). Incluídas também as recomendações específicas do Capítulo 52 do Compendium (Gray & Pinkas, 2001), para a análise de gomas, pectina e celulose e as do Capítulo 8 do Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Frank & Yousef, 2004), para a análise de produtos lácteos.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

7.2.1.MATERIAL REQUERIDO PARA ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml
- Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem por plaqueamento em superfície

- Placas de Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (para alimentos com atividade de água maior que 0,95 e produtos lácteos em geral)
- Placas de Ágar Dicloran Glicerol 18 (DG-18) (para alimentos com atividade de água menor ou igual a 0,95, exceto produtos lácteos)
- Placas de Ágar Extrato de Levedura Glicose Cloranfenicol (YEGC) opcional para produtos lácteos com predomínio de leveduras ou com leveduras injuriadas)
- Alça de espalhamento (alça de Drigalski) mergulhada em etanol 70%
- Estufa incubadora regulada entre 22 e 25°C (25±1ºC para produtos lácteos) com termômetro calibrado

7.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem de bolores e leveduras em placas encontra-se descrito na Figura 7.1.

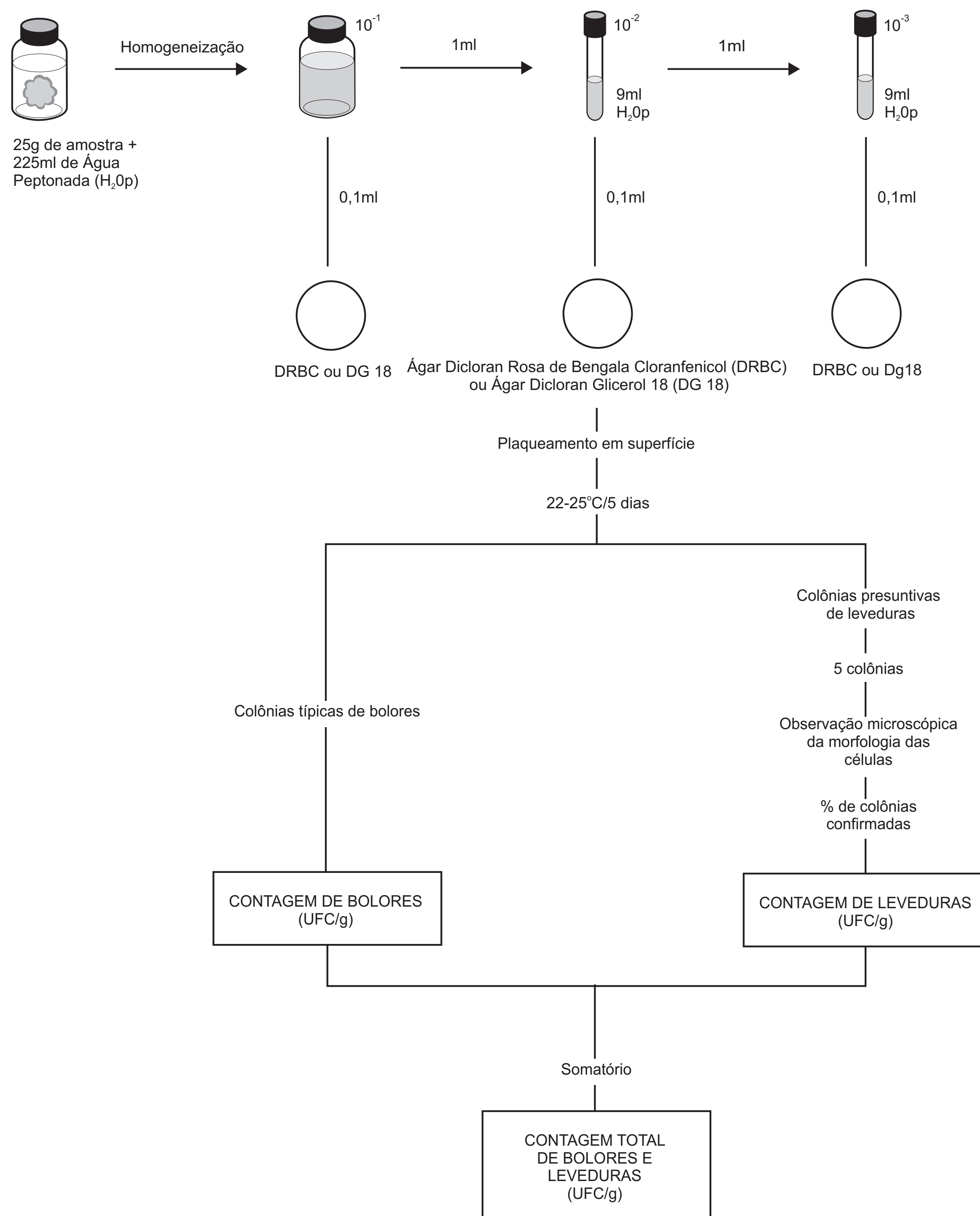


Figura 7.1. Esquema geral de análise para contagem de bolores e leveduras em placas (Beuchat & Cousin, 2001).

a) Preparação das amostras e diluições seriadas

Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2. Para alimentos de umidade intermediária, manter a amostra de molho no diluente por um certo período de tempo, para amolecer o produto e facilitar a liberação dos microrganismos presentes.

b) Inoculação

Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular (plaqueamento em superfície) 0,1ml de cada diluição em placas previamente preparadas e secadas, de um dos seguintes meios de cultura:

- Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), para alimentos com atividade de água maior que 0,95 e produtos lácteos em geral.
- Ágar Dicloran Glicerol 18 (DG-18), para alimentos com atividade de água menor ou igual a 0,95, exceto produtos lácteos. No caso da análise de matérias primas destinadas à formulação de produtos com atividade de água maior que 0,95, para verificar a contagem de potenciais deteriorantes do produto final, utilizar o Ágar DRBC.
- Ágar Extrato de Levedura Glicose Cloranfenicol (YEGC), opcional para produtos lácteos com predomínio de leveduras ou com leveduras injuriadas.
- Ágar Batata Dextrose Acidificado, opcional para produtos lácteos não submetidos ao calor, acidificação ou outro tratamento que possa provocar injúrias às células

Espalhar o inóculo com uma alça de Drigalski, das placas de maior para as placas de menor diluição, até que todo o excesso de líquido seja absorvido. Se as contagens estimadas na amostra forem menores do que 100/g ou ml, inocular 1ml da primeira diluição, distribuindo o volume por quatro placas, três com 0,3ml e uma com 0,1ml.

Nota b1) Na análise de espessantes (gomas, pectina, celulose) a diluição inicial deve ser maior do que 1:10, em função da viscosidade desses produtos. Se as contagens esperadas são baixas, pode ser feito o plaqueamento direto de 1g da amostra na placa, espalhando o material por toda a superfície (Gray & Pinkas, 2001).

Nota b.2) Antes do uso, estocar as placas de DRBC ou DG-18 em geladeira, protegidas contra a luz, para evitar a fotodegradação do rosa de bengala, com formação de compostos inibidores para os bolores e leveduras.

c) Incubação

Aguardar que as placas sequem (mínimo 15 minutos) e incubar a 22-25°C por cinco dias, sem inverter, em pilhas de não mais de três placas, no escuro. Recomenda-se não contar as colônias antes de cinco dias, porque a movimentação das placas pode resultar em crescimento secundário (devido ao deslocamento de esporos), invalidando a contagem final.

Nota c.1) O Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Frank & Yousef, 2004) recomenda incubação a 25±1°C por 5±0,5 dias para a análise de produtos lácteos.

Nota c.2) A International Commission on Food Mycology (ICFM) recomenda incubação a 25°C/5dias como condição padrão. Pitt & Hocking (2009) recomendam 30°C/5dias para produtos estocados à temperatura ambiente em regiões tropicais e 22ºC/5dias em regiões temperadas como a Europa.

d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados

Para a contagem de colônias e cálculo dos resultados, selecionar as placas com 15 a 150 colônias e contar as colônias com o auxílio de uma lupa, em um contador de colônias.

Na placa selecionada, contar separadamente as colônias com aspecto filamentoso, cotonoso ou pulverulento, características de bolores, anotando o resultado.

Na mesma placa, contar as demais colônias, que podem ser de leveduras ou de bactérias, eventualmente capazes de crescer. Selecionar pelo menos cinco dessas colônias e verificar a morfologia das células ao microscópio, observando se a cultura é de leveduras, bactérias ou mistura de ambas. Para isso, pode ser feita uma montagem úmida ou uma coloração de Gram, conforme procedimento descrito no Capítulo 5. Considerar como confirmadas todas as colônias que apresentarem leveduras ou mistura de leveduras e bactérias. Determinar o número de colônias de leveduras na placa em função da porcentagem confirmada. Por exemplo, de 30 colônias contadas, cinco foram submetidas à confirmação e três foram confirmadas como leveduras (60%). Então, o numero de colônias de leveduras na placa é de 30x0,6=18.

O cálculo dos resultados deve ser feito de acordo com as orientações do Capítulo 3. Para calcular o número de UFC/g ou ml de bolores, multiplicar o número de colônias típicas de bolores por dez e pelo inverso da diluição. Para calcular o número de UFC/g ou ml de leveduras, multiplicar o número de colônias confirmadas como leveduras por dez e pelo inverso da diluição. Para calcular o número total de bolores e leveduras, somar o número de colônias de bolores e o número de colônias confirmadas como leveduras e multiplicar por dez e pelo inverso da diluição.

Exemplo

-Diluição 10-2 (inoculados 0,1ml)

-Total de colônias típicas de bolores na placa = 30

-Colônias presuntivas de leveduras na placa = 40, cinco submetidas à confirmação, quatro confirmadas (80%)

-Total de colônias de leveduras na placa = 40x0,8 = 32

-UFC/g ou ml de bolores = 30x102x10 = 3,0x10^4.

-UFC/g ou ml de leveduras = 32x102x10 = 3,2x10^4.

-UFC/g ou ml de bolores e leveduras = (30+32)x10^2x10 = 6,2x10^4.

7.3. MÉTODO DE CONTAGEM DE FUNGOS PSICOTRÓFICOS

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 13 da 4o Edição do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Cousin et al., 2001).

O esquema geral de análise para contagem de fungos psicrotróficos em placas encontra-se descrito na Figura 7.2.

Segue o mesmo procedimento da contagem total de bolores e leveduras, alterando a condição de incubação, que pode ser 7±1°C por 10 dias ou 17±1°C por 16 horas, seguido de mais 3 dias a 7±1°C.

Na preparação das amostras, a homogeneização em "stomacher" é mais indicada do que em liqüidificador, que pode favorecer a fragmentação dos micélios, alterando a contagem. Se for necessário usar liqüidificador, não ultrapassar dois minutos de homogeneização.

Os meios recomendados são o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), para alimentos em geral (pode ser substituído pelo PCA suplementado com 100mg/l de cloranfenicol) e o Ágar Dicloran Glicerol 18 (DG-18), para alimentos com atividade de água menor que 0,95).

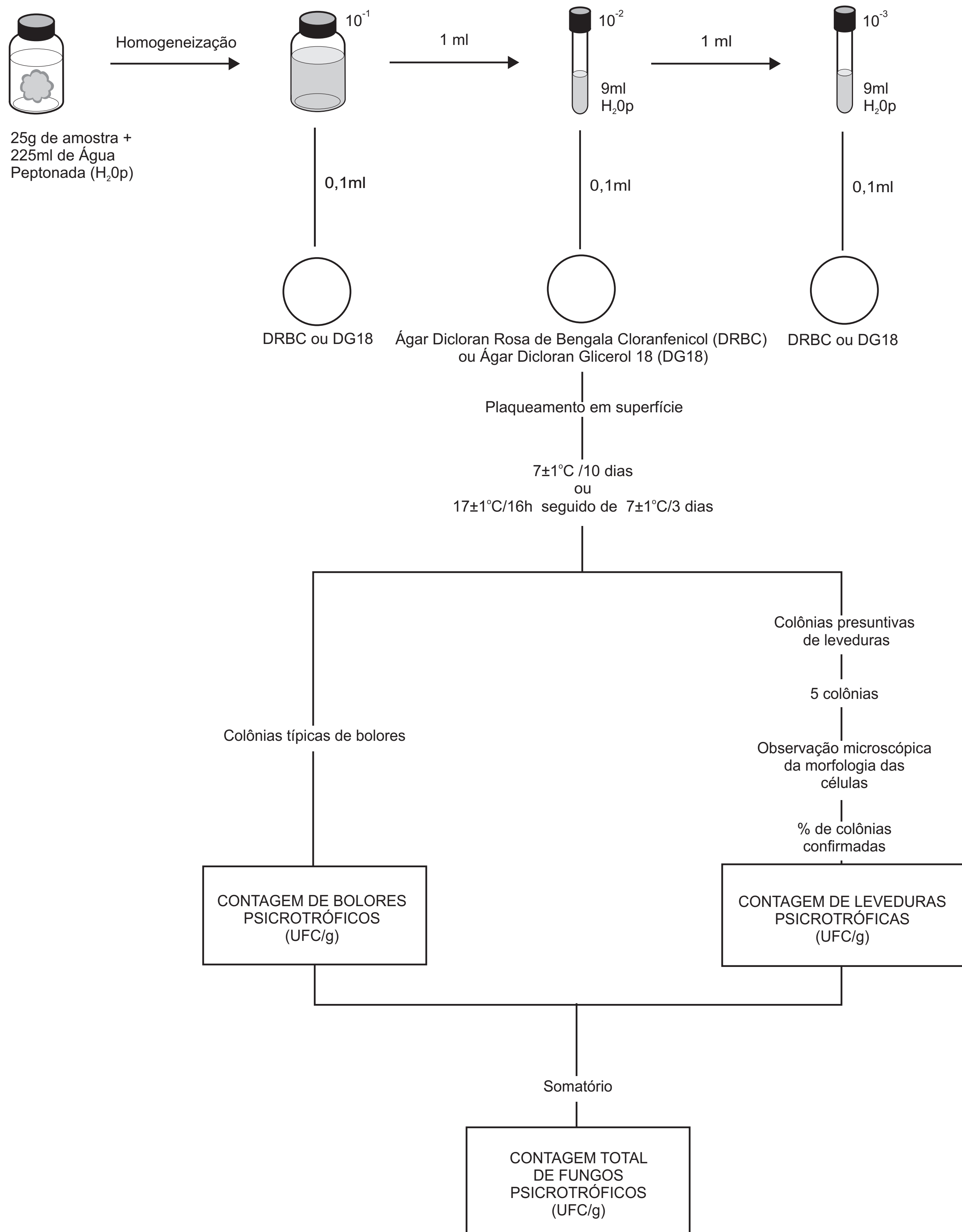


Figura 7.2. Esquema geral de análise para contagem de fungos psicrotróficos em placas (Cousin *et al.*, 2001).

7.4. MÉTODO DE CONTAGEM DE BOLORES TERMORRESISTENTES

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 21 da 4o Edição do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Beuchat & Pitt, 2001).

7.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Água destilada estéril
- Liquidificador ou "stomacher" e bolsas estéreis para homogeneização da amostra
- Ágar Batata Dextrose (PDA) com Antibióticos ou Ágar Extrato de Malte (MEA) com Antibióticos, em concentração 1,5
- Tubos de 200x30mm ou Erlenmeyers de 250ml
- Placas de Petri estéreis de diâmetro 150 mm
- Banho-maria fechado regulado a 75-80°C e termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 30±1°C e termômetro calibrado

7.4.2. PROCEDIMENTO

Atenção. Todas as etapas da análise para detecção de bolores termorresistentes devem ser realizadas em capela de fluxo laminar, para evitar a contaminação acidental da amostra por bolores do ambiente.

a) Choque térmico

a.1) Para a análise de frutas ou polpas contendo pedaços de frutas, pesar 100g da amostra em um copo de liquidificador estéril, adicionar 100ml de água destilada estéril e homogeneizar por 5min ou pelo tempo necessário para obter uma suspensão homogênea. Colocar o copo em uma bolsa plástica estéril e transferir para um banho-maria fechado, com a temperatura controlada entre 75 e 80°C. Manter no banho por 90min, garantindo que a superfície do produto permaneça abaixo da superfície da água do banho. Alternativamente, pesar 100g da amostra em uma bolsa plástica estéril, adicionar 100ml de água destilada estéril e homogeneizar em "stomacher", por 2-4min. Após a homogeneização, transferir duas porções de 50ml para tubos de 200x30mm e colocar os tubos em um banho-maria fechado, com a temperatura controlada entre 75 e 80°C. Manter no banho por 30min, garantindo que a superfície do produto permaneça abaixo da superfície da água do banho.

a.2) Para a análise de sucos de frutas não concentrados (Brix < 35°), transferir três porções de 50ml da amostra para tubos de 200x30mm e utilizar um dos tubos para ajustar o pH em 3,4-3,6, com NaOH 10%. Anotar o volume de NaOH consumido no ajuste e adicionar assepticamente, aos dois demais tubos, igual quantidade de NaOH 10% estéril. Descartar o tubo manuseado e transferir os dois demais para um banho fechado, com a temperatura controlada entre 75 e 80°C. Manter no banho por 30min, garantindo que a superfície do produto permaneça abaixo da superfície da água do banho.

a.3) Para a análise de sucos de frutas concentrados (Brix > 35°), pesar 100g da amostra em uma bolsa plástica estéril, adicionar 200ml de água destilada estéril e homogeneizar em

"stomacher". Após a homogeneização, transferir três porções de 50ml para tubos de 200x30mm, ajustar o pH e continuar a análise da mesma forma descrita para sucos não concentrados.

b) Inoculação

Distribuir as porções de 100ml em oito placas de Petri grandes (150mm de diâmetro) ou as porções de 50ml em quatro placas. Adicionar a cada placa, 10ml de Ágar Batata Dextrose (PDA) ou Ágar Extrato de Malte (MEA) com antibióticos e com 1,5 vezes a concentração normal. Misturar bem a amostra com o meio de cultura e aguardar solidificar.

Nota b.1) Pitt & Hocking (2009) descrevem o seguinte procedimento alternativo: Pesar duas porções de 50g da amostra em sacos de "stomacher" ou em Erlenmaeyers de 250ml. Amostras com Brix maior que 35º devem ser diluídas, na proporção 1:1, com água peptonada 0,1%. Amostras muito ácidas, devem ter seu pH ajustado em 3,5 a 4,0 com NaOH 10%. Submeter à choque térmico em banho a 80ºC/30min. Após o choque térmico, misturar cada porção de 50ml da amostra com 50ml de Ágar Extrato de Malte (MEA), em dupla concentração, previamente fundido e resfriado a 50-60oC. Homogeneizar bem e distribuir em cinco placas de Petri estéreis, vazias, aguardando a completa solidificação. Incubar as placas a 30ºC por 30 dias, observando semanalmente.

c) Incubação

Transferir as placas para uma bolsa plástica estéril, fechar bem a bolsa, para evitar o ressecamento do meio de cultura e incubar a 30ºC por até 30 dias, examinando semanalmente. A maioria dos esporos viáveis normalmente germinará e formará colônias visíveis em 7-10 dias, porém, esporos injuriados pelo calor poderão requerer um período adicional para desenvolver colônias.

d) Cálculo dos resultados

Contar as colônias desenvolvidas em todas as placas e calcular o resultado como número de esporos/100g ou ml.

7.5. MÉTODOS DE CONTAGEM DE LEVEDURAS RESISTENTES AOS CONSERVANTES (PRY)

Métodos descritos no Capítulo 4 da 3ª Edição do Fungi and Food Spoilage (Pitt & Hocking, 2009) e no Capítulo 20 da 4ª Edição do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (DiGiacomo & Gallagher, 2001).

7.5.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Método qualitativo de detecção com enriquecimento

- Tubos com 20ml de Caldo Triptona Glicose Extrato de Levedura 0,5% de Ácido Acético (TGYB)
- Placas de Ágar Triptona Glicose Extrato de Levedura 0,5% de Ácido Acético (TGYA)
- Pipetas de 1 ou 2ml
- Estufa incubadora regulada a 30ºC e termômetro calibrado

Método de contagem direta em placas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml
- Placas de Ágar Triptona Glicose Extrato de Levedura 0,5% de Ácido Acético (TGYA) ou Agar Extrato de Malte 0,5% Ácido Acético (MAA)
- Estufa incubadora regulada a 30ºC e termômetro calibrado

7.5.2. PROCEDIMENTO

Pitt & Hocking (2009) descrevem dois procedimentos para leveduras resistentes aos conservantes, um qualitativo (presença/ausência) com enriquecimento prévio das amostras e o outro de contagem direta em placas, que é o mesmo do Compendium.

a) Método qualitativo de detecção com enriquecimento

Descrito no Capítulo 4 da 3ª Edição do Fungi and Food Spoilage (Pitt & Hocking, 2009), esse método é o mais indicado para amostras em que a população de leveduras resistentes aos conservantes pode ser muito baixa, mas ainda assim potencialmente capaz de provocar a deterioração.

Procedimento. Inocular três alíquotas de 1g ou 1ml da amostra em três tubos com 20ml de Caldo Triptona Glicose Extrato de Levedura 0,5% de Ácido Acético (TGYB). Incubar os tubos a 30ºC/48-72h. Após a incubação, inocular 0,1ml de cada tubo em uma placa separada de Ágar Triptona Glicose Extrato de Levedura 0,5% de Ácido Acético (TGYA) (plaqueamento em superfície). Incubar as placas a 30ºC/48-72h e observar se há desenvolvimento de colônias. Apenas leveduras resistentes aos conservantes vão se desenvolver nesse método.

> **Nota a.1)** O Agar Extrato de Malte 0,5% Ácido Acético (MAA) pode ser usado em lugar do TGYA, mas, segundo os autores, a recuperação é melhor no TGYA, porque seu pH (3,8) é um pouco mais alto do que o do MAA (3,2) e a concentração de glicose também é maior (10%) do que no MAA (2%).

b) Método de contagem direta em placas

Descrito no Capítulo 4 da 3ª Edição do Fungi and Food Spoilage (Pitt & Hocking, 2009) e no Capítulo 20 da 4ª Edição do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Beuchat & Cousin, 2001). Esse método é o mais indicado para amostras com população alta de leveduras resistentes aos conservantes, porque permite a inoculação de diluições.

Procedimento. Homogeneizar 25g da amostra com 225ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB), seguindo os procedimentos descritos no capítulo 2. Selecionar três diluições adequadas e inocular 0,1ml de cada diluição em placas de Ágar Triptona Glicose Extrato de Levedura 0,5% de Ácido Acético (TGYA) ou Agar Extrato de Malte 0,5% Ácido Acético (MAA) (plaqueamento em superfície). Incubar as placas a 30ºC por três a cinco dias e observar se há desenvolvimento de colônias. Contar todas as colônias, porque apenas leveduras resistentes aos conservantes vão se desenvolver nesses meios. Calcular os resultados de acordo com as orientações do capítulo 3.

> **Nota b.1)** O capítulo 59 do Compendium (DiGiacomo & Gallagher, 2001) também indica o Preservative Resistant Yeasts Medium (PRY) para a contagem em placas.

7.6. MÉTODOS DE CONTAGEM DE LEVEDURAS OSMOFÍLICAS

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 17 da 4o Edição do Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Baross, 2001).

7.6.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Método de filtração em membrana

- Água destilada estéril
- Conjunto de filtração à vácuo
- Filtros-membrana de poro 0,80 mm
- Proveta graduada estéril
- Placas de Ágar Extrato de Malte Extrato de Levedura 40% Glicose (MY40G)
- Estufa incubadora regulada a 30±1°C e termômetro calibrado

Método de plaqueamento em profundidade

- Tampão Fosfato pH 7,2 suplementado com 40% de glicose (peso/peso)
- Tubos de diluição com 9ml de Tampão Fosfato pH 7,2 suplementado com 40% de glicose (peso/peso)
- Placas de Petri estéreis
- Ágar Extrato de Malte Extrato de Levedura 40% Glicose (MY40G)
- Estufa incubadora regulada a 30±1°C e termômetro calibrado

7.6.2. PROCEDIMENTO

O Compendium apresenta dois procedimentos para a contagem de leveduras osmofílicas, um usando a técnica de filtração em membrana e outro usando a técnica de plaqueamento direto.

a) Método de filtração em membrana

Esse método é recomendado para amostras líquidas não deterioradas, sem sólidos em suspensão, como açúcar (líquido ou não, diluído) ou água de enxágue das linhas, nas quais a população de leveduras osmofílicas pode ser muito baixa, mas ainda assim potencialmente capaz de provocar a deterioração. É importante considerar que a diluição da amostra com água destilada estéril, embora seja necessária para permitir a filtração, pode provocar choque osmótico sobre as leveduras osmofílicas presentes. A possível redução no número de UFC obtido deve sempre ser levado em consideração na interpretação dos resultados.

Procedimento. Pesar 25g da amostra concentrada e adicionar 25 a 50ml de água destilada estéril, homogeneizando bem (no caso de amostras de água de enxágue das linhas de processamento não há necessidade de diluir). Filtrar em filtro-membrana de poro 0,80mm, com a face quadriculada voltada para cima. Antes que a membrana seque, lavar as paredes do copo do sistema de filtração com 100ml de água destilada estéril, filtrando todo o volume de água para lavar a membrana. Desligar a bomba de vácuo antes que a membrana seque excessivamente. Transferir a membrana para uma placa de Ágar Extrato de Malte Extrato de Levedura 40% Glicose (MY40G), colocando-a sobre a superfície do meio, com a face quadriculada voltada para cima. Incubar a placa a 30ºC por cinco a sete dias.

Nota a.1) Recomenda-se que a filtração de amostras de açúcar líquido seja feita, preferencialmente, em porta filtros de metal, porque os porta filtros porosos são de difícil limpeza e sanitização após a filtração desse tipo de produto.

b) Método de plaqueamento em profundidade

Esse método é recomendado para amostras que não permitem filtração, como sucos concentrados e xaropes de frutas. Também é o mais indicado para amostras com população alta de leveduras osmofílicas, porque permite a inoculação de diluições.

Procedimento. Pesar 25g da amostra e adicionar 225ml de Tampão Fosfato pH 7,2 suplementado com 40% de glicose (peso/peso) (diluição 10-1). No caso da análise de açúcar, preparar o diluente sem adição de glicose e adicionar 40% da própria amostra (ou o peso equivalente, no caso do açúcar líquido) ao diluente, considerando essa diluição como a amostra sem diluição. Preparar as diluições subseqüentes, utilizando o mesmo diluente. Inocular 1ml da amostra sem diluição, 1ml da 10^{-1} e 1ml da 10^{-2} em placas de Petri estéreis e adicionar aproximadamente 20ml de Ágar Extrato de Malte Extrato de Levedura 40% Glicose (MY40G). Selecionar diluições mais altas no caso de amostras deterioradas, em que as contagens esperadas sejam maiores. Incubar as placas a 30ºC por cinco a sete dias e contar as colônias com o auxílio da lupa de um contador de colônias. Somente as leveduras osmofílicas serão capazes de se desenvolver no Ágar MY40G e suas colônias serão diminutas após esse período de incubação, porque a velocidade de crescimento desses microrganismos é baixa, nas condições de atividade de água do meio.

7.7. REFERÊNCIAS

AOAC, 2009. Rapid Methods Adopted as AOAC Official Methods. Disponível no site <http://www.aoac.org/vmeth/oma_testkits.pdf>, acesso em 08/02/2010.

BAROSS, J.A. Halophilic and Osmophilic microorganisms. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 17, p.187-199.

BAYNE, H.G. & MICHENER, H.D., 1979. Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores. *Appl. Environ. Microbiol. 37*:449-453.

BEUCHAT, L.R. & COUSIN, M.A. Yeasts and molds. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 20, p.209-215.

BEUCHAT, L.R. & PITT, J.I. Detection and enumeration of heat resistant molds. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 21, p.217-222.

CASELLA, M.L.A., MATASCI, F & SCHMIDT-LORENZ, W., 1990. Influence of age, growth medium, and temperature on heat resistance of *Byssochlamys nivea* ascospores. *Lebensm. Wiss. Technol. 23*:404-411.

COUSIN, M.A., JAY, J.M. & VASAVADA, P.C. Psychrotrophic microrganisms. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 13, p.159-166.

DiGIACOMO, R. & GALLAGHER, P. Soft Drinks. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 59, p.569-571.

DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

FRANK, J.F. & YOUSEF, A.E. Tests for groups of microrganisms. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th Ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 8, p.227-248.

GRAY, R.J.H. & PINKAS, J.M. Gums and spices. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 52, p.533-540.

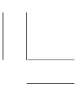
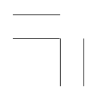
KING, A.D., MICHENER, H.D. & ITO, K.A., 1969. Control of *Byssochlamys* and related heat-resistant fungi in grape products. *Appl. Microbiol.* 18:166-173.

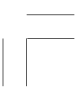
PITT, J.I. & HOCKING, A.D. (eds). *Fungi and Food Spoilage, 2rd Ed.* Springer, London, 2009.

SPLITTSTOESSER, D.F. & SPLITTSTOESSER, C.M., 1977. Ascospores of *Byssochlamys fulva* compared with those of heat resistant *Aspergillus. J. Food Sci. 42*:685-688.

TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T. & BANHE, A.A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. *Journal of Food Mycology, 2*: 291-302, 1999.

WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th Ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004.



Capítulo 8

Contagem de Enterobactérias

8.1. INTRODUÇÃO

A maioria das orientações contidas nesse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001). Quando diferentes ou complementares às do *Compendium*, foram também incluídas recomendações da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004), específicas para a análise de produtos lácteos.

Taxonomia

As informações abaixo são da 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner & Farmer III, 2005).

Enterobactérias é como vulgarmente se chamam os membros da família *Enterobacteriaceae*, que inclui as bactérias Gram negativas na forma de bastonetes retos, não esporogênicas, anaeróbias facultativas e oxidase negativas (exceto o gênero *Plesiomonas*, recentemente transferido para essa família). São quimiorganotróficas com metabolismo respiratório e fermentativo, a maioria produzindo ácidos e gás na fermentação da glicose e outros carboidratos. Não são halofílicas, produzem catalase (exceto *Xenorhabdus* e algumas cepas de *Shigella dysenteriae*) e reduzem nitrato a nitrito (exceto *Saccharobacter fermentatus* e algumas cepas de *Erwinia* e *Yersinia*).

Escherichia é o gênero tipo da família, que inclui diversos outros gêneros de importância em alimentos, como *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*. Na família também se encontram as bactérias dos grupos coliformes totais e coliformes termotolerantes (coliformes fecais), discutidos no capítulo específico. O número de gêneros e espécies da família tem aumentado continuamente, sendo 12 gêneros e 36 espécies em 1974, 20 gêneros e 76 espécies 1984, 30 gêneros e 107 espécies em 1994 e 44 gêneros e 176 espécies em 2005, nessa 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

As enterobactérias são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, animais, insetos e no homem. Várias espécies são patogênicas para plantas e animais, respondendo por perdas econômicas expressivas na agricultura e na indústria de alimentos. *Erwinia* e *Pectobacterium*, por exemplo, provocam alterações em milho, batatas, maçãs, cana de açúcar, abacaxis e outros produtos vegetais. *Yersinia ruckeri* e várias espécies de *Edwardsiella* provocam doenças em peixes tropicais, afetando diretamente o setor pesqueiro. *Klebsiella* e *Citrobacter freundii* são causadores de mastite em bovinos.

Várias enterobactérias são também patogênicas para o homem, representando risco para a saúde pública em todo o mundo. *Salmonella* é a mais importante, sendo as aves, os ovos, os ovinos e os suínos os principais veículos de salmoneloses para humanos. Outros gêneros e espécies patogênicas veiculadas por alimentos são *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Enterobacter sakazakii* e cepas de *E. coli* enteropatogênicas, incluindo as enterohemorrágicas (EHEC) como *E. coli* O157:H7.

As enterobactérias são utilizadas como indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativadas pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha.

São mesófilas mas cepas psicrotróficas não são incomuns, principalmente dentro dos gêneros *Yersinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* e *Hafnia*.

Métodos de análise

A quantificação de enterobactérias pode ser feita pelo método de contagem padrão em placas, utilizando o Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG) como meio de cultivo. O VRBG é um meio seletivo diferencial contendo cristal violeta e sais biliares, que inibem bactérias Gram positivas. A fermentação da glicose resulta em ácidos, detectados pelo indicador de pH vermelho neutro (viragem para vermelho) e pela formação de uma zona de precipitação de sais biliares em torno das colônias.

Para produtos com baixas contagens, é recomendada a técnica do Número Mais Provável (NMP), com duas etapas: A primeira é o enriquecimento seletivo em Caldo de Enriquecimento para *Enterobacteriaceae* (EEB) e a segunda é o isolamento de colônias típicas no Ágar VRBG. No EEB, a presença de bile e verde brilhante inibe grande parte da microbiota acompanhante. Além disso, a alta capacidade tamponante do meio previne o efeito deletério da redução do pH sobre as enterobactérias. Esse procedimento também pode ser aplicado como um simples teste de presença/ ausência, se a quantificação não for necesária.

Outro método recomendado no Capítulo 8 do *Compendium* (Kornacki & Johnson, 2001) e no Capítulo 7 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Davidson *et al.*, 2004) é o Petrifilm *Enterobacteriaceae* da 3M Company (AOAC Official Method 2003.1), que segue o mesmo princípio da contagem em placas de VRBG.

8.2. MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS DE VRBG

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 8 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kornacki & Johnson, 2001).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

8.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)

• Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem por plaqueamento em profundidade

- Placas de Petri de 20 x 100mm estéreis vazias
- Meio de cultura: Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG)
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado

8.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise de enterobactérias pelo método de contagem em placas de VRBG encontra-se descrito na Figura 8.1.

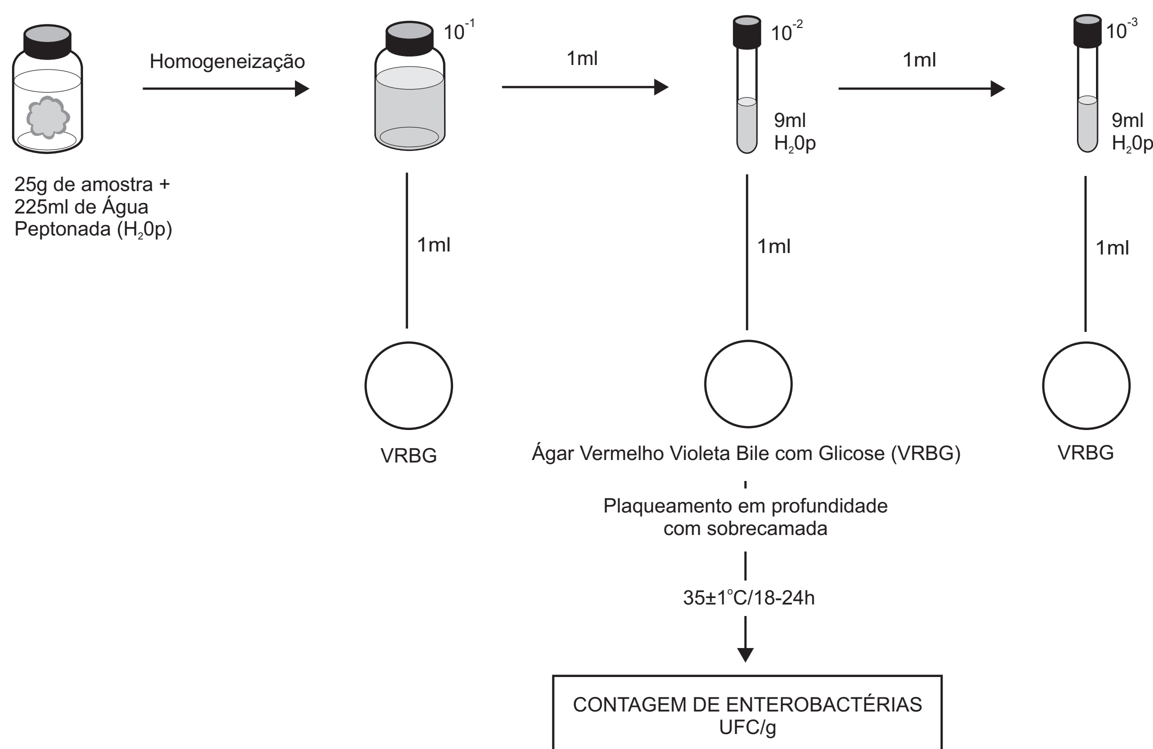


Figura 8.1. Esquema de análise de enterobactérias pelo método de contagem em placas de VRBG (Kornacki & Johnson, 2001).

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular em Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG) para enterobactérias. Utilizar a técnica de plaqueamento em profundidade e, após a completa solidificação do meio, cobrir com uma sobrecamada de 5-8ml do mesmo meio.

c) Incubação. Incubar as placas na posição invertida, a 35±1°C/18-24h.

Nota c.1) Tradicionalmente a contagem de enterobactérias é feita a 35°C, mas incubação em temperaturas mais baixas (4, 10, 25 ou 30°C) pode ser mais eficaz na análise de alimentos refrigerados, nos quais se espera a presença de cepas psicrotróficas. Essas cepas são, freqüentemente, incapazes de crescer a 35°C, mas podem crescer a 30°C e vão crescer em temperaturas mais baixas.

d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Selecionar placas com 15-150 colônias e contar apenas as colônias típicas de enterobactéria no VRBG: vermelho púrpura, com 0,5mm ou mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares. Em placas muito cheias as colônias são menores, não atingindo 0,5mm. Determinar o número de UFC/g ou ml multiplicando o número de colônias típicas pelo inverso da diluição.

8.3. MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 8 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kornacki & Johnson, 2001).

A contagem de enterobactérias pelo NMP é indicada para amostras com baixas contagens, abaixo do limite de detecção do plaqueamento. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

8.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Enriquecimento e plaqueamento

- Caldo de Enriquecimento de *Enterobacteriaceae* (EEB)
- Placas de Ágar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG)
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado

8.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema da análise de enterobactérias pelo método do Número Mais Provável encontra-se descrito na Figura 8.2.

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

> **Nota a.1)** Se não houver necessidade de quantificar, bastando determinar a presença/ausência de enterobactérias na amostra, a preparação pode ser feita diretamente no Caldo de enriquecimento, passando ao item incubação.

b) Inoculação (teste presuntivo). Inocular três alíquotas de 10ml da primeira diluição (10^{-1}) em três tubos com 10ml de Caldo de Enriquecimento de *Enterobacteriaceae* (EEB) em concentração dupla, três alíquotas de 1ml da 10^{-1} em três tubos com 10ml de EEB concentração simples e três alíquotas de 1ml da 10^{-2} em três tubos com 10ml de Caldo de EEB concentração simples.

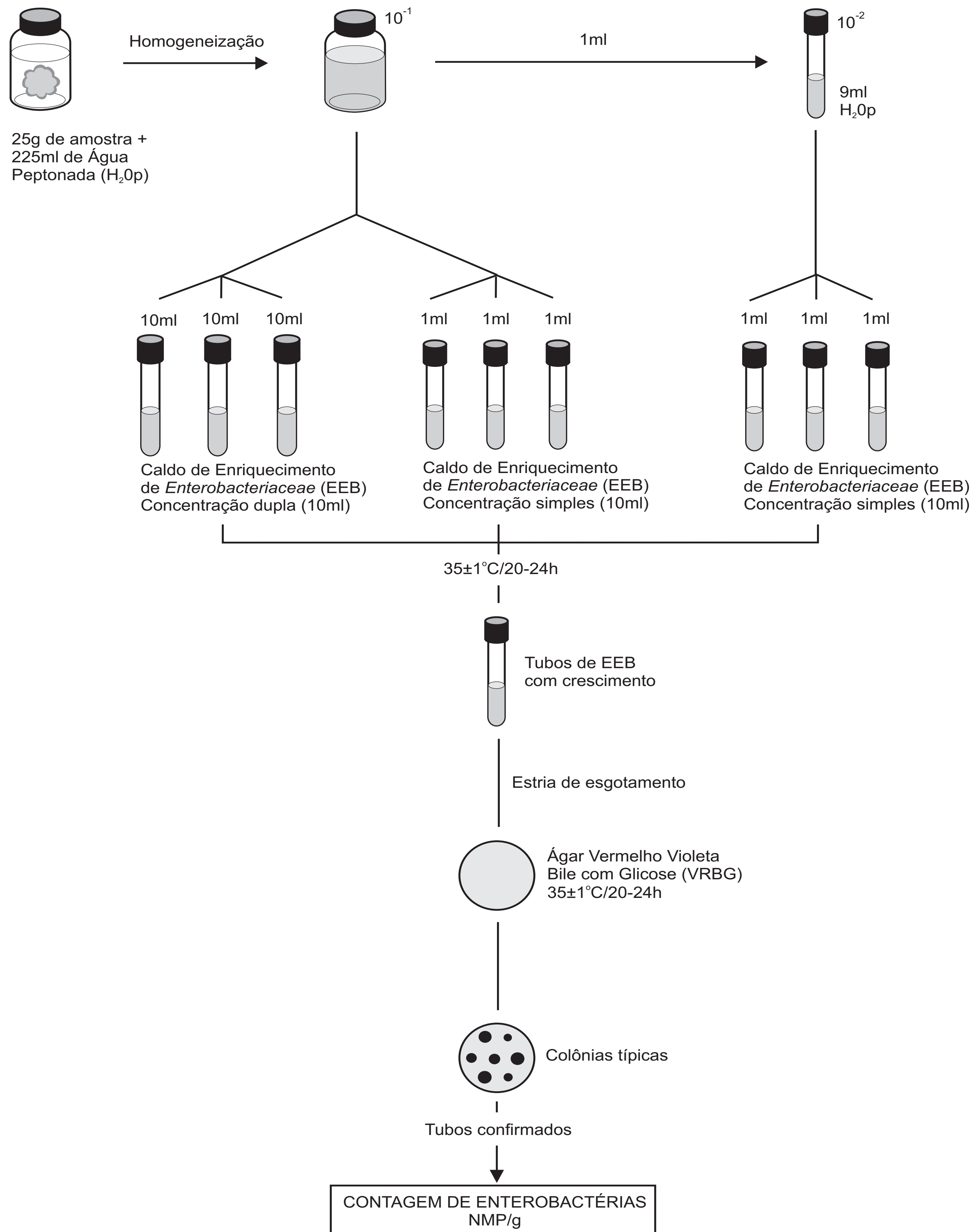


Figura 8.2. Esquema de análise de enterobactérias pelo método do NMP (Kornacki & Johnson, 2001).

c) Incubação. Incubar os tubos de EEB a 35±1°C/20-24h e observar se há crescimento. Em caso positivo, passar aos itens subsequentes.

Nota c.1) Se houver interesse em contar apenas as enterobactérias mesófilas, sem incluir as cepas psicrotróficas, incubar o caldo EEB a 43°C/18h.

d) Confirmação de enterobactérias. A partir de cada tubo com crescimento em EEB, estriar (estrias de esgotamento) uma alçada da cultura em Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG). Incubar as placas a 35±1°C/20-24h. Observar se há desenvolvimento de colônias típicas de enterobactérias, vermelho púrpura, com 0,5mm ou mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares.

e) Cálculo dos resultados. Anotar o número de tubos confirmados e determinar o NMP/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

8.4. MÉTODO DO PETRIFILM™

Método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC Official Method 2003.1), descrito no Capítulo 8 do *Compendium* (Kornacki & Johnson, 2001) e no Capítulo 7 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Davidson *et al.*, 2004).

Petrifilm™ (3M Company) é uma modificação da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas, composto por dois filmes estéreis reidratáveis, impregnados pelo meio de cultura e por substâncias geleificantes solúveis em água fria. A inoculação é feita no filme inferior que, depois de inoculado, é coberto com o filme superior. O inóculo é espalhado com um difusor de plástico, por leve pressão manual e, depois da solidificação do gel, as placas são incubadas para desenvolvimento de colônias. O meio de cultura é o Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG) suplementado com cloreto de trifeniltetrazolium (indicador que, ao sofrer redução, confere coloração vermelha às colônias) e com um indicador de pH (para detectar a fermentação com produção de ácido, com ou sem produção de gás). As colônias típicas são vermelhas, com um halo amarelo e associadas ou não com bolhas de gás.

8.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada

Inoculação e incubação

- Placas de Petrifilm *Enterobacteriaceae*
- Difusor plástico
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado

8.4.2. PROCEDIMENTO

Observação. O procedimento abaixo é orientativo, devendo sempre ser verificadas e obedecidas as instruções do fabricante.

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2, porém, não usar diluentes contendo citrato, bissulfito ou tiossulfato, porque podem inibir o crescimento nos petrifilms. Nos casos em que esses diluentes sejam recomendados no Capítulo 2, substituir por Tampão Fosfato (PB). Após a homogeneização, retirar uma alíquota de volume conhecido e verificar o pH. Se necessário, acertar o pH da alíquota na faixa de 6,5 a 7,5 com NaOH ou HCl 1N, verificando o volume de ácido ou base consumido na correção. Adicionar à amostra um volume proporcional da solução estéril.

b) Inoculação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e, de cada diluição, inocular 1ml em uma placa de Petrifilm *Enterobacteriaceae*. Para tanto, seguir as orientações do fabricante, apresentadas a seguir: Colocar a placa em uma superfície plana, levantar o filme superior e posicionar a ponta da pipeta perpendicular ao centro do filme inferior. Depositar o volume de 1ml e baixar o filme superior sobre o líquido, evitando a formação de bolhas. Posicionar o difusor plástico sobre centro do filme superior, com o lado liso para baixo. Com leve pressão, espalhar o líquido sobre todo o filme inferior. Não arrastar o difusor sobre a placa, apenas pressionar levemente. Remover o difusor e aguardar dois a cinco minutos, para a total solidificação do gel.

Nota b.1) Para a seleção das diluições, seguir as orientações do Capítulo 3, porque o Petrifilm segue o mesmo princípio da contagem em placas.

Nota b.2) Alguns alimentos podem interferir na visualização das colônias na primeira diluição, como é o caso de café, chocolate ou ervas secas (muito escuros).

c) Incubação. Incubar as placas a 35±1°C/24±2h, com o lado transparente para cima, em pilhas com não mais de 20 placas.

Nota c.1) Pode ser necessário umidificar a incubadora, para que não ocorra desidratação das placas. A perda de umidade, indicada pela perda de peso, não deve ser superior a 15%, após a incubação.

d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Selecionar para contagem as placas com 15 a 100 colônias. Contar apenas as colônias típicas, que podem ser de três tipos: vermelhas com bolhas de gás e sem halo amarelo, vermelhas com halo amarelo e sem bolhas de gás ou vermelhas com halo amarelo e bolhas de gás. Determinar o número de UFC/g ou ml multiplicando o número de colônias típicas pelo inverso da diluição (UFC/g ou ml = N° colônias/diluição).

Nota d.1) Não contar as colônias presentes na espuma da borda do filme, pois essas não se encontram sob a ação dos agentes seletivos. Não enumerar bolhas de ar artificiais.

Nota d.2) A área de crescimento circular das placas de petrifilm é de aproximadamente $20cm^2$. Em placas com mais de 150 colônias, a contagem pode ser estimada contando-se o número de colônias em um ou mais quadrados representativos e calculando-se a média por quadrado. Multiplicar então por 20, para determinar o número total de colônias por placa.

Nota d.3) Uma vez completado o tempo de incubação, as placas podem ser armazenadas sob congelamento (15°C negativos ou menor), para contagem posterior.

8.5. REFERÊNCIAS

BRENNER, D.J. & FARMER III, J.J. Family I. *Enterobacteriaceae.* In: BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005. p.587-607.

DAVIDSON, P.M., ROTH, L.A., GAMBREL-LENARZ, S.A. Coliform and other indicator bacteria. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 7, p.187-226.

DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

KORNACKI, J.L. & JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 8, p.69-82.

WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2004.

Capítulo 9

Contagem de Coliformes Totais
Coliformes Termotolerantes
Escherichia coli

9.1. INTRODUÇÃO

A maioria das informações e orientações contidas nesse capítulo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001). Quando diferentes ou complementares às do *Compendium*, foram também incluídas recomendações da 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Eaton *et al.*, 2005), específicas para a análise de água, e da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004), específicas para a análise de produtos lácteos.

Definição de coliformes totais

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* que, na 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner & Farmer III, 2005), inclui 44 gêneros e 176 espécies. No grupo dos coliformes totais estão apenas as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies se encaixam nessa definição, dentre as quais encontrando-se tanto bactérias originárias do trato gastrintestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*), como também bactérias não entéricas (espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*, dentre outras).

A capacidade de fermentar a lactose pode ser verificada pela formação de gás e/ou ácido, nos meios de cultivo contendo lactose. Essas características são utilizadas nos métodos tradicionais de contagem de coliformes totais. Os métodos mais modernos detectam diretamente a atividade da enzima β-galactosidase, envolvida no metabolismo fermentativo da lactose, incorporando substratos para a enzima nos meios de cultivo. Um desses substratos é o ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo) que, quando degradado pela β-galactosidase, resulta num produto de reação amarelo. Outros são o X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiraniosídeo), que resulta num produto de reação intensamente azul e o Salmon-Gal (6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo), cujo produto de degradação é salmão a vermelho.

Definição de coliformes termotolerantes

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originários do trato gastrintestinal (*E. coli*), porém, atualmente sabe-se que o

grupo inclui membros de origem não fecal (várias cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*). Em função disso, o termo coliformes fecais tem sido, gradativamente, substituído por coliformes termotolerantes.

E. coli

E. coli está incluída tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. É tradicionalmente distinguida dos demais coliformes termotolerantes pelas características de crescimento no Ágar L-EMB (Levine Eosina Azul de Metileno) e pelo perfil dos testes de indol, vermelho de metila, Voges Proskauer e citrato (IMViC). Os métodos mais modernos diferenciam *E. coli* através da verificação da atividade da enzima β-glicuronidase, produzida por 96% das cepas, incluindo as anaerogênicas (Feng & Hartman, 1982). Um dos substratos para verificar a atividade β-glicuronidase é o MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo), que quando é degradado pela β-glicuronidase, resulta em 4-metilumbeliferona, fluorescente sob luz UV. Outro é o BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicuronídeo), também chamado de X-β-D-Glicuronídeo, que quando é degradado pela enzima, forma um produto de reação azul.

Aplicação como indicadores

E. coli foi inicialmente introduzida como indicador em 1892 na Austrália e em 1895 nos Estados Unidos. Foi usada para indicar a contaminação da água por matéria fecal e, consequentemente, alertar para a presença potencial de patógenos entéricos (*Salmonella*, por exemplo). O padrão foi mudado para coliformes totais em 1915, pelo U.S. Public Health Service, baseado na premissa (questionável) de que todos os coliformes apresentavam igual valor como indicadores de contaminação fecal. Da água foram estendidos aos alimentos, sem uma avaliação muito criteriosa da validade dessa aplicação em diferentes produtos. Atualmente, a premissa de que altos números de *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias em alimentos estão correlacionados com contaminação fecal já não é válida, por uma série de razões: 1) *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, podendo ser encontrados em reservatórios ambientais. 2) Esses organismos são comuns nos ambientes de manufatura de alimentos, podendo se tornar parte da microbiota residente (principalmente se as condições de limpeza são inadequadas). 3) Várias cepas de *E. coli*, coliformes ou enterobactérias podem crescer em alimentos refrigerados.

Com base nesses fatos, a FAO (Food and Agricultural Organization) e a OMS (Organização Mundial da Saúde) concluíram que não é possível avaliar a segurança (inocuidade) de alimentos em função dos níveis de *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias. Um alto índice desses microrganismos pode estar, em certas circunstâncias, relacionado com uma maior probabilidade de presença de patógenos entéricos, porém, freqüentemente não está. Da mesma forma, sua ausência nem sempre significa que os produtos estejam livres de bactérias entéricas patogênicas. A principais aplicações desses microrganismos como indicadores, na verdade são:

a) Enterobactérias e coliformes - indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha.

b) Coliformes – indicadores de falha de processo ou de contaminação pós processo em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico.
c) *E. coli* – indicador de contaminação fecal em alimentos "in natura" (mas não em alimentos processados).

Métodos de análise

Método do NMP. O método clássico de contagem de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* em água e alimentos é o do Número Mais Provável (NMP), que inclui as seguintes etapas: 1º) Teste presuntivo, em que três alíquotas de três diluições da amostra são inoculadas em uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) por diluição. O LST contém lactose e a observação de crescimento com produção de gás a partir da lactose, após 24-48h de incubação a 35ºC, é considerada suspeita (presuntiva) da presença de coliformes. 2º) Para a confirmação dos coliformes totais e termotolerantes, uma alçada de cada tubo suspeito é transferida para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e Caldo *E. coli* (EC), meios seletivos que contém lactose. A observação de crescimento com produção de gás nos tubos de VB, após 24-48h de incubação a 35ºC, é considerada confirmativa da presença de coliformes totais. Crescimento com produção de gás nos tubos de EC, após 24h de incubação a 45,5ºC (ou 44,5ºC, no caso de água), é considerada confirmativa da presença de coliformes termotolerantes. 3º) Os tubos de EC positivos para coliformes termotolerantes são suspeitos da presença de *E. coli*. Para a confirmação, uma alçada de cada tubo é estriada em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB), meio seletivo diferencial para distinguir *E. coli* dos demais coliformes termotolerantes. Se houver desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli* no L-EMB, duas dessas colônias são isoladas para as provas bioquímicas de indol, VM, VP e citrato (IMViC). São consideradas confirmadas as culturas com os perfis: ++-- (biotipo 1) ou -+-- (biotipo 2).

No método clássico do NMP, a última etapa do teste é opcional e muitos laboratórios terminam a análise na confirmação de coliformes termotolerantes. Quando é feita a confirmação de *E. coli*, o ensaio é chamado de teste completo. Na análise de água a 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) recomenda procedimentos diferentes desse para a confirmação de *E. coli*. Um deles é a transferência das culturas suspeitas obtidas no LST para tubos de Caldo EC com MUG. Após incubação a 44,5ºC/24h, as culturas que apresentarem fluorescência azul sob luz UV são consideradas confirmadas. Outro procedimento é a transferência do LST para Caldo Triptona 1%, incubação a 44,5ºC/24h e teste de indol. As culturas positivas no teste de indol são consideradas confirmadas.

No método do NMP da ISO (7251:2005) para coliformes termotolerantes em alimentos, a incubação do Caldo EC é feita a 44+1ºC e a confirmação presuntiva de *E. coli* também utiliza o teste de indol, após crescimento em Caldo Triptona a 44+1ºC. A principal vantagem desse método é que a variação aceitável na temperatura é de +1ºC, que pode ser obtida em estufas incubadoras. No *Compendium* a variação máxima aceitável é de +0,2ºC, o que exige um banho-maria para a incubação. O grande problema é que os banhos com essa estabilidade são bastante dispendiosos, bem como termômetros capazes de detectar essa variação.

Método do substrato cromogênico. Para a determinação de coliformes totais e *Escherichia coli* em água, um método extremamente simples e prático é o do substrato cromogênico e fluorogênico (COLILERT®) AOAC 991.15. É uma técnica cultural baseada na adição de um meio de cultura

definido e diferencial à amostra, em que o exato balanceamento entre todos os componentes garante a especificidade do resultado. O meio contém dois substratos para enzimas: a) orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG), substrato para a enzima β-galactosidase dos coliformes, cujo produto de reação é amarelo. b) 4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo (MUG), substrato para para a enzima β-glicuronidase de *E. coli*, cujo produto de reação é fluorescente sob luz UV. O ensaio pode ser feito de duas formas: a) Presença/ausência em 100 mL, adicionado-se o meio de cultura à 100 mL da amostra (o meio desidratado estéril é comercializado em ampolas, na quantidade necessária para 100 mL de amostra). b) Número mais provável (NMP) em 100 mL, fracionando-se os 100 mL em 10 alíquotas de 10 mL.

Método de contagem em placas. Para a contagem de coliformes totais em alimentos, o *Compendium* (Kornacki & Johnson, 2001) e o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Davidson *et al.*, 2004) também recomendam o método de contagem direta em placas de Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB). Esse método segue o mesmo princípio da contagem de enterobactérias, descrito no capítulo específico, mas utiliza lactose em lugar de glicose, no VRB.

Outros métodos. Outros métodos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) são os "kits" analíticos descritos no Quadro 9.1.

Quadro 9.1. "Kits" analíticos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a contagem de coliformes totais e/ou *E. coli* em alimentos).

Analito	Fabricante	Nome do "kit	Validação	Aplicação
Coliformes totais e *E. coli*	BioControl Systems, Inc.	Colitrak	AOAC Official Method 966.24	Todos os alimentos
Coliformes totais	3M Microbiology Products	Petrifilm Coliform Count Plate	AOAC Official Methods 986.33, 989.10, 991.14	Carnes, aves, pescados e produtos de pesca, alimentos
Coliformes totais e *E. coli*	BioControl Systems, Inc.	ColiTrak Plus	AOAC Official Method 988.19	Todos os alimentos
Coliformes totais	3M Microbiology Products	Redigel Violet Red Bile Medium for Coliform	AOAC Official Method 989.11	Produtos lácteos
E. coli	3M Microbiology Products	Petrifilm *E. coli* Count Plate	AOAC Official Methods 991.14, 998.08	Alimentos, carnes, aves, pescados e produtos de pesca
Coliformes totais e *E. coli*	Idexx Laboratories Inc.	Colilert	AOAC Official Method 991.15	Água
Coliformes totais e *E. coli*	BioControl Systems, Inc.	ColiComplete	AOAC Official Method 992.30	Todos os alimentos
Coliformes totais	3M Microbiology Products	Petrifilm High Sensitivity Coliform Count Plate	AOAC Official Method 996.02	Produtos lácteos
Coliformes totais	3M Microbiology Products	Petrifilm Rapid Coliform Count Plate	AOAC Official Method 2000.15	Alimentos
Coliformes totais e *E. coli*	BioControl Systems, Inc.	SimPlate Coliform and *E. coli* Color Indicator (CEc-CI)	AOAC Official Method 2005.03	Alimentos

Fontes: AOAC, 2009. Rapid Methods Adopted as AOAC Official Methods. Disponível no site <http://www.aoac.org/vmeth/oma_testkits.pdf>, acesso em 28/08/09.

9.2. MÉTODO APHA DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) Coliformes Totais/Termotolerantes/*E. coli* em Água e Alimentos

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 8 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kornacki & Johnson, 2001). Incluídas também as recomendações específicas do Capítulo 7 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Davidson *et al*., 2004), para a análise de produtos lácteos, e as da Seção 9221 do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005), para a análise de água. Aplicação: análise de água e de todos os alimentos.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

9.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem de coliformes totais e termotolerantes

- Tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durhan
- Tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) com tubos de Durhan
- Tubos de Caldo *E. coli* (EC) com tubos de Durhan
- Cepa padrão positiva (cultura de *E. coli* com 24 horas)
- Cepa padrão negativa (cultura de *E. aerogenes* com 24 horas)

Contagem de *E. coli* (método tradicional para alimentos) (opcional)

- Placas de Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB)
- Tubos de Ágar Padrão para Contagem (PCA) inclinados
- Tubos de Caldo Citrato de Koser ou Ágar Citrato de Simonns
- Tubos de Caldo Triptona 1%
- Tubos de Caldo VM-VP
- Reagente de Kovacs para teste de indol
- Solução de Vermelho de Metila para teste de VM
- Reagentes de Barrit para teste de VP (solução de alfa-naftol 5%, solução de KOH 40%, creatina em cristal)

Contagem de *E. coli* (método EC-MUG para água) (opcional)

- Tubos de Caldo *E. coli* com 4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo (EC-MUG)

Contagem de *E. coli* (método do indol para água) (opcional)

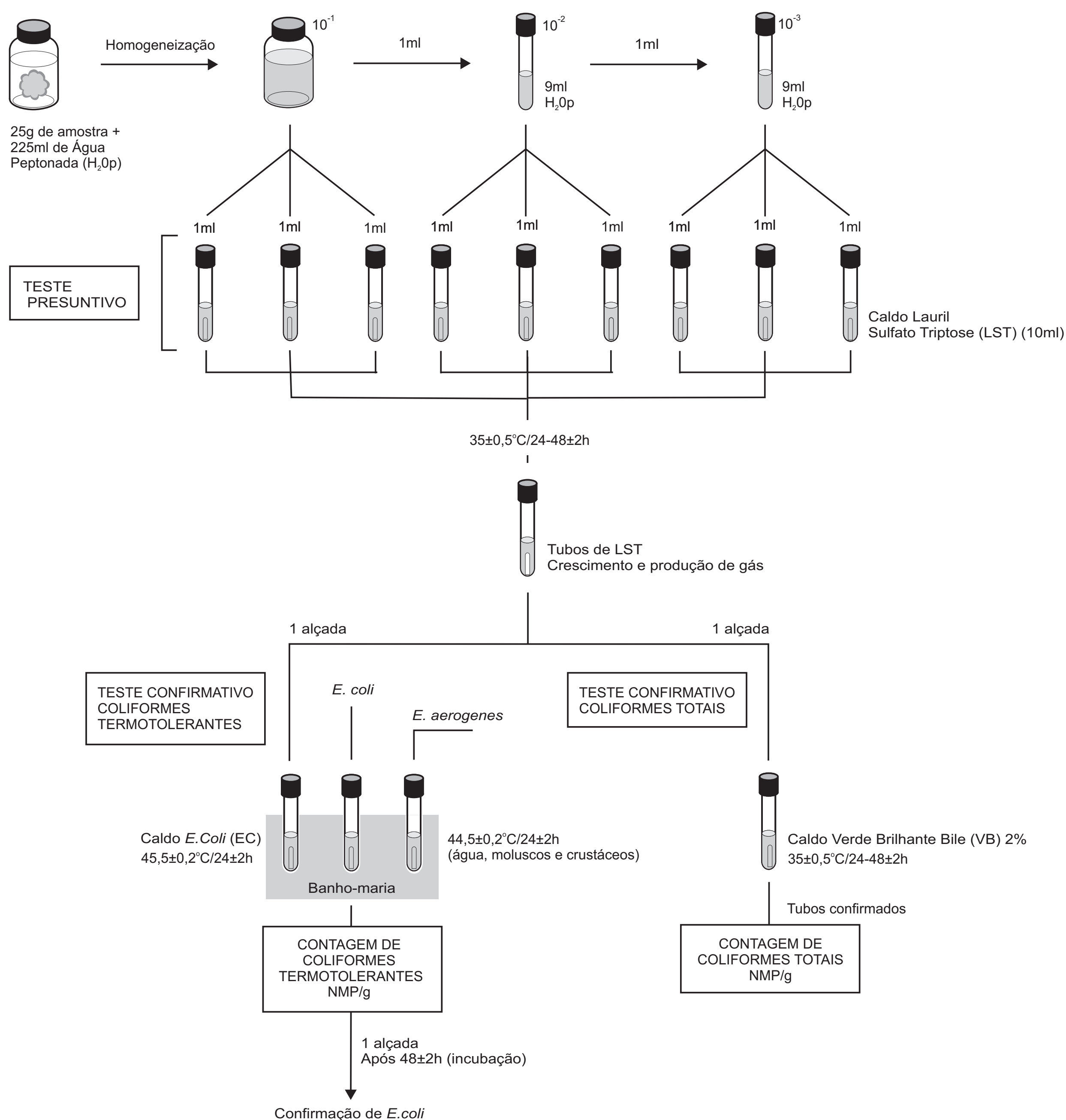
- Tubos de Caldo Triptona 1%
- Reagente de Kovacs para teste de indol

Incubação

- Estufa incubadora regulada a 35±0,5°C com termômetro calibrado
- Banho-maria de temperatura controlada a 45,5±0,2°C (para alimentos em geral) com termômetro calibrado
- Banho-maria de temperatura controlada a 44,5±0,2°C (para água, pescados, moluscos) com termômetro calibrado

9.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* pelo método APHA do Número Mais Provável encontra-se descrito nas Figuras 9.1 (análise de alimentos) e 9.2 (análise de água).



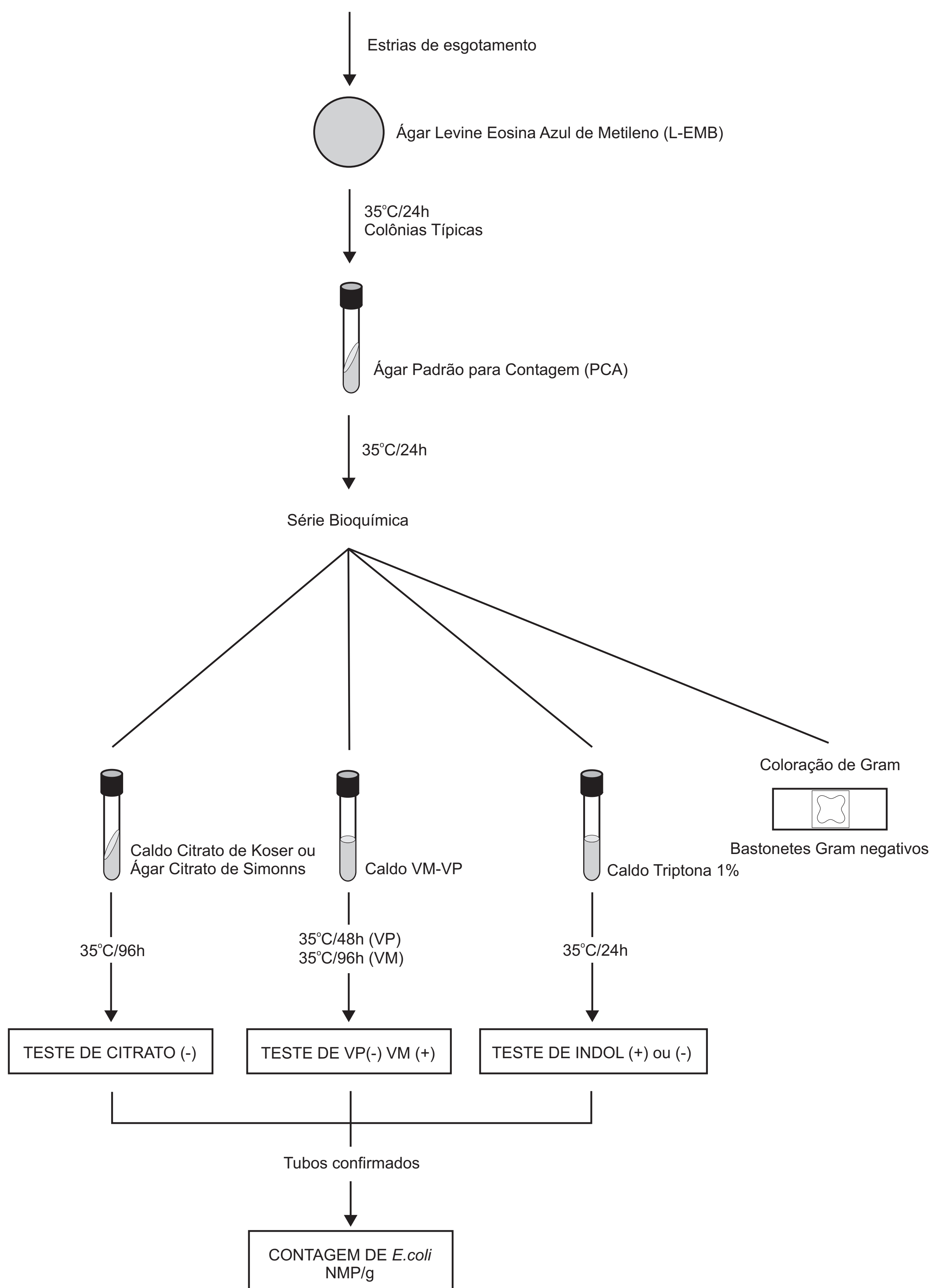


Figura 9.1. Esquema de análise de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* em alimentos pelo método APHA do NMP (Kornacki & Johnson, 2001).

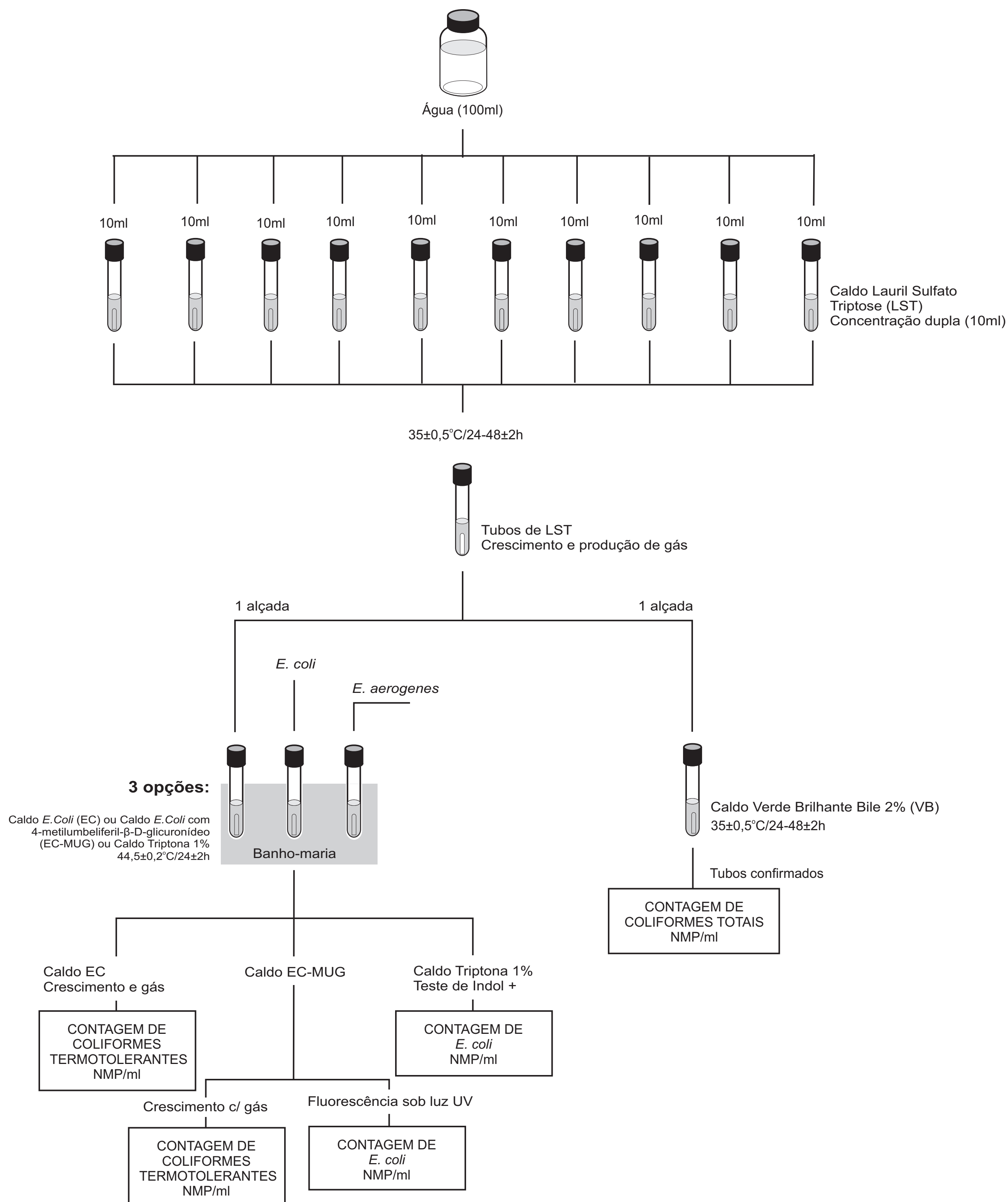


Figura 9.2. Esquema de análise de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* em água pelo método APHA do NMP (Hunt & Rice, 2005).

a) Preparação das amostras e diluições seriadas

Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação (teste presuntivo)

Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) por diluição, adicionando 1ml da diluição por tubo com 10ml de LST.

Nota b.1) Na análise de água para consumo humano, normalmente é feito o teste de diluição única: Inocular dez alíquotas de 10ml da amostra em dez tubos com 10ml de LST em concentração dupla ou cinco alíquotas de 20ml em cinco tubos com 10ml de LST em concentração tripla.

Nota b.2) Na análise de sucos, refrescos e refrigerantes também é mais comum o teste de diluição única, inoculando-se seis alíquotas de 10ml da amostra em seis tubos com 10ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), em concentração dupla. A um dos tubos é adicionado solução de hidróxido de sódio (NaOH 1N ou 0,6%) até que o pH atinja 6,0. O volume de NaOH consumido é anotado, o tubo é descartado e, aos outros cinco é adicionado, em condições asssépticas, idêntica quantidade de NaOH estéril.

Nota b.3) No exame de moluscos e crustáceos (ostras, mexilhões e mariscos, camarão, etc), o *Compendium* recomenda utilizar uma série de cinco tubos.

Nota b.4) Na análise de amostras ácidas, como maionese e outras coberturas para saladas, por exemplo, recomenda-se neutralizar a acidez da amostra antes da inoculação nos tubos de LST. Para isso, homogeneizar bem a primeira diluição, retirar uma alíquota de volume conhecido e verificar o pH. Ajustar em 6,0 com NaOH 1N, verificando o volume de base consumido na correção da alíquota. Adicionar à amostra um volume proporcional da solução de NaOH estéril. Alternativamente, utilizar o tampão fosfato pH 7,2 como diluente, o que pode eliminar a necessidade de neutralização, porém, recomenda-se verificar antes da inoculação dos tubos de LST.

c) Incubação

Incubar os tubos de LST a 35±0,5°C/24±2h e observar se há crescimento com produção de gás. Em caso positivo (crescimento e produção de gás), passar aos itens subseqüentes. Em caso negativo (crescimento e/ou produção de gás), reincubar até completar 48±2h e repetir a leitura, passando para os itens subseqüentes em caso de crescimento com produção de gás.

Nota c.1) A variação de temperatura estabelecida pelo *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* na incubação é de ± 1°C. No *Compendium* e no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* é de ± 0,5°C.

d) Contagem de coliformes totais

A partir dos tubos de LST com produção de gás, transferir uma alçada bem carregada de cada cultura para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB). Incubar a 35±0,5°C/24±2h e observar se há crescimento com produção de gás. Em caso negativo (crescimento e/ou produção de gás), reincubar até completar 48±2h e repetir a leitura.

Anotar o número de tubos de VB com crescimento e produção de gás, confirmativos da presença de coliformes totais. Determinar o Número Mais Provável (NMP)/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

e) Contagem de coliformes termotolerantes

A partir dos tubos de LST com produção de gás, transferir uma alçada bem carregada de cada cultura para tubos de Caldo *E. coli* (EC). Incubar por 24±2 horas em banho-maria a 45,5±0,2°C

(maioria dos alimentos) ou 44,5±0,2°C (água, crustáceos e moluscos) e observar se há crescimento com produção de gás.

Nota e.1) A incubação dos tubos de EC deve ser sempre acompanhada de um tubo inoculado com a cepa padrão positiva (*E. coli*) e um tubo inoculado com a cepa padrão negativa (*Enterobacter aerogenes*). Todos os tubos devem permanecer mergulhados na água, até uma altura superior à superfície do meio de cultura. O intervalo entre a inoculação e a transferência para o banho de incubação não deve ultrapassar 30min.

Nota e.2) Na indisponibilidade de mais de um banho para a incubação de diferentes tipos de alimentos, o *Compendium* recomenda utilizar um único banho regulado a 45±0,2°C. No caso de água, essa orientação aplica-se apenas à água engarrafada, porque o *Compendium* não trata da análise de outro tipo de água.

Nota e.3) Se a análise for continuar até a confirmação e contagem de *E. coli* pelo método tradicional (item f), deve-se reincubar os tubos de EC por 24 horas adicionais, submetendo à confirmação os tubos positivos em 48±2h.

Anotar o número de tubos de EC com produção de gás, confirmativo da presença de coliformes termotolerantes. Determinar o Número Mais Provável (NMP)/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

f) Contagem de *E. coli* em alimentos (opcional)

Procedimento do *Compendium* e do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products.*

De cada tubo de EC com produção de gás em 48±2h, estriar (estrias de esgotamento) uma alçada da cultura em placas de Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB). Incubar as placas a 35±1°C/24±2h e observar se há desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli* (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico).

Havendo colônias típicas, transferir duas colônias bem isoladas de cada placa, para tubos de Ágar Padrão para Contagem (PCA) inclinados e incubar os tubos a 35±1°C/24±2h.

A partir das culturas puras em PCA, fazer coloração de Gram e inocular os meios teste abaixo, para realização de provas bioquímicas de indol, VM, VP e citrato (IMViC). Todos os meios podem ser inoculados a partir de uma única alçada de cultura, porém, o Caldo Citrato de Koser (ou o Ágar Citrato de Simmons) deve ser inoculado em primeiro lugar, para evitar a introdução de compostos de carbono originários dos demais meios teste.

f.1) Teste de citrato (caldo citrato de Koser). Inocular uma alçada com inóculo leve da cultura, incubar a 35°C/96h e observar se há crescimento (teste positivo) ou não (teste negativo). As cepas de *E. coli* são citrato-negativas. Alternativamente, pode-se utilizar o Ágar Citrato de Simmons para o teste de citrato. Transferir um inóculo leve da cultura para a rampa dos tubos de Ágar Citrato de Simmons e incubar a 35°C/96h. O crescimento com viragem alcalina, alterando a cor do meio de verde para azul, é indicativo de teste positivo. O não crescimento e a não alteração da cor do meio indicam teste negativo.

f.2) Teste de indol (caldo triptona 1%). Inocular uma alçada com inóculo leve da cultura e incubar a 35°C/24±2h. Adicionar cinco gotas do reagente de Kovacs a cada 4ml de cultura e agitar levemente. Observar se há desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo) ou se o anel permanece na cor amarela do reagente (teste negativo) As cepas de *E. coli* podem ser indol positivas ou negativas.

f.3) Teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer (caldo VM-VP). Inocular uma alçada com inóculo leve da cultura e incubar a 35ºC/48±2h. Para o teste de VP, transferir assepticamente 1ml da cultura para um tubo de ensaio, adicionar 0,6ml de solução de α-naftol 5% e agitar. Adicionar em seguida 0,2ml de solução de KOH 40%, agitar e adicionar uma pitada leve de cristais de creatina, para acelerar a reação. Deixar descansar e observar periodicamente, por até uma hora, o desenvolvimento de uma cor vermelha ou rósea no meio de cultura (teste positivo). A permanência do meio na cor do reagente (amarelada ou ligeiramente esverdeada) indica teste negativo. As cepas de *E. coli* são VP negativas. Reincubar a cultura remanescente no caldo VM-VP por 48 horas adicionais e realizar o teste de VM com 96 horas de incubação. Para a realização do teste, adicionar a cada 2,5ml da cultura, cinco gotas da solução de vermelho de metila, observando imediatamente se o meio adquire uma coloração vermelha (teste positivo) ou amarela (teste negativo). As cepas de *E. coli* são VM positivas.

Considerar como *E. coli* todas as culturas com as seguintes características: bastonetes Gram negativos, indol (+) ou (-), VM (+), VP (-) e citrato (-). Anotar em quantos tubos de caldo EC foi confirmada a presença de *E. coli* e determinar o Número Mais Provável (NMP)/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

g) Contagem de *E. coli* em água (opcional)

Pode ser usado um dos procedimentos abaixo, descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.*

g.1) Método do EC-MUG. De cada tubo de LST com crescimento e produção de gás, inocular uma alçada em tubos de EC-MUG (Caldo *E. coli* suplementado com 0,05g/l de 4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo). Incubar os tubos a 44,5±0,2ºC/24±2h e observar os tubos com crescimento sob lâmpada de luz ultravioleta (6w), ondas longas (365nm). O desenvolvimento de fluorescência azul indica a presença de *E. coli.*

g.2) Método do indol. De cada tubo de LST com crescimento e produção de gás, inocular uma alçada em tubos de Caldo Triptona 1% para teste de indol. Incubar os tubos a 44,5±0,2ºC/24±2h e adicionar a cada tubo (com 3-5ml de cultura) 0,2 a 0,3ml de Reagente de Kovacs para teste de indol. O desenvolvimento de um anel vermelho violeta na superfície do meio de cultura indica a presença de *E. coli.*

Anotar em quantos tubos de caldo LST foi confirmada a presença de *E. coli* e determinar o Número Mais Provável (NMP)/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

9.3. MÉTODO APHA DE PLAQUEAMENTO EM VRB
Coliformes Totais em Alimentos

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 8 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kornacki & Johnson, 2001) e no Capítulo 7 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Davidson *et al.*, 2004). Aplicação: análise de todos os alimentos.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

9.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem de coliformes totais

- Placas de Petri de 20 x 100mm estéreis vazias
- Meio de cultura: Ágar Vermelho Violeta Bile com Lactose (VRB)
- Tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) com tubos de Durhan
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C (32±1°C para leite e produtos lácteos) com termômetro calibrado

9.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise de coliformes totais por plaqueamento em VRB encontra-se descrito na Figura 9.3.

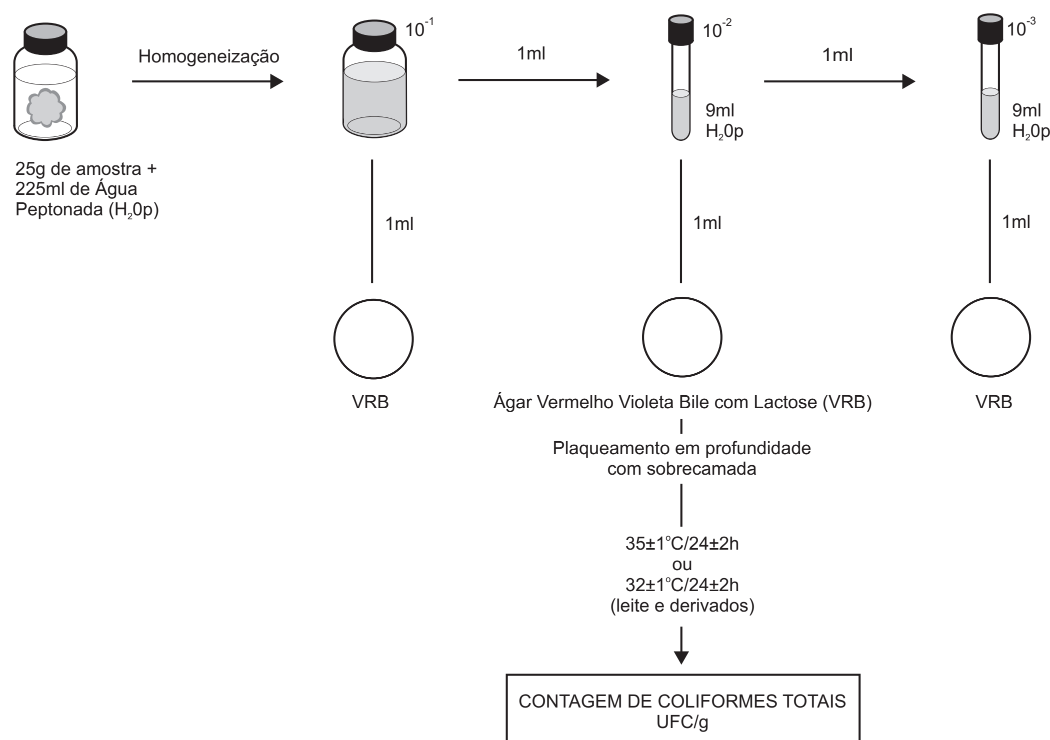


Figura 9.3. Esquema de análise de coliformes totais por plaqueamento em VRB (Davidson *et al.*, 2004, Kornacki & Johnson, 2001).

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular em Ágar Vermelho Violeta Bile com Lactose (VRB). Utilizar a técnica de plaqueamento em profundidade e, após a completa solidificação do meio, cobrir com uma sobrecamada de 5-8ml do mesmo meio.

Nota b.1) Na contagem de coliformes totais em amostras processadas com suspeita de injúria sub letal, o *Compendium* recomenda fazer o plaqueamento em Agar Tripticase de Soja (TSA), manter algumas horas à temperatura ambiente e, em seguida, fazer uma sobrecamada com VRB e incubar. O *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* recomenda fazer o plaqueamento em TSA, manter as placas a 32±1ºC/2±0,5h e, em seguida, cobrir com uma sobrecamada de VRB fortificado (com dupla concentração de sais biliares, vermelho neutro e cristal violeta) e incubar.

Nota b.2) Para a contagem de coliformes totais e também *E. coli*, o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* recomenda o seguinte procedimento, para a análise de leite, derivados de leite, sobremesas lácteas, queijos manteiga e produtos lácteos desidratados: Suplementar o VRB com 100µg/l de MUG e proceder da maneira usual, para a contagem de coliformes totais. Para a contagem de *E. coli*, observar as placas sob lâmpada de luz ultravioleta (6w), ondas longas (365nm). As colônias com desenvolvimento de fluorescência azul são contadas como *E. coli*. A orientação da nota b.1 também se aplica nesse caso, suplementando o TSA e o VRB (fortificado) com a mesma concentração de MUG.

c) Incubação/contagem das colônias e cálculo dos resultados. Incubar as placas na posição invertida, a 35±1ºC/24±2h (32±1ºC no caso de leite e derivados). Selecionar placas com 15-150 colônias e contar apenas as colônias típicas de coliformes totais (vermelho púrpura, com 0,5mm ou mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares). Determinar o número de UFC/g ou ml multiplicando o número de colônias típicas pelo inverso da diluição.

d) Confirmação de colônias com aspecto duvidoso em VRB. A confirmação é recomendada quando as colônias apresentam aspecto duvidoso (comum em placas muito cheias) ou quando as placas foram inoculadas com amostras contendo quantidades significativas de outros carboidratos que não a lactose (açúcar, por exemplo). Para a confirmação, transferir uma alçada de cada colônias suspeita para tubos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e incubar a 35±1ºC/24-48h (32±1ºC no caso de leite e derivados). Considerar como coliforme total (colônia confirmada) todos os tubos com crescimento e produção de gás, sem película superficial. Havendo gás e película superficial, submeter a cultura à coloração de Gram e teste de oxidase, considerando como coliformes totais todas as culturas de bastonetes Gram negativos oxidase negativos.

9.4. MÉTODO DO COLI COMPLETE™ AOAC 992.30
Coliformes Totais e *E. coli* em Alimentos

Método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC Official Method 992.30), incluído no Capítulo 8 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kornacki & Johnson, 2001). Aplicação: análise de todos os alimentos.

O método do Coli Complete™ é uma modificação do método do numero mais provável clássico, que incorpora ao Caldo LST um disco impregnado com dois substratos: o 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiraniosídeo (X-GAL), para a enzima β-galactosidase dos coliformes, e o 4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo (MUG), para a enzima β-glicuronidase de *E. coli*.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

9.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparação da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem de coliformes totais e *E. coli*

- Meio de cultura: tubos com 10ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST)
- Substratos: discos de Coli Complete™ (BioControl Systems, Inc.)
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado
- Lâmpada de luz ultravioleta (6w), ondas longas (365nm)

9.4.2. PROCEDIMENTO

Observação. O procedimento abaixo é orientativo, devendo sempre ser verificadas e obedecidas as instruções do fabricante.

a) Preparação da amostra, diluições seriadas e inoculação. Seguir o mesmo procedimento descrito no método do NMP (item 9.2), porém, os tubos de LST não precisam conter o tubo de Durhan. Após a inoculação da amostra, adicionar a cada tubo de LST inoculado, um disco do Coli Complete™ (BioControl Systems, Inc.).

> **Nota a.1)** Alguns vidros utilizados na manufatura de tubos de ensaio podem apresentar uma fluorescência natural sob luz UV. Por essa razão, deve-se verificar a ausência de fluorescência em todos os tubos destinados ao teste com Coli Complete.

b) Incubação. Incubar os tubos de LST a 35±1°C/30±2h e observar se há crescimento com produção de um precipitado azul insolúvel, indicativo da presença de coliformes totais. Observar também a ocorrência de fluorescência azul sob lâmpada de luz ultravioleta (6W, ondas longas de 365nm), indicativa da presença de *E. coli*. Não sendo observada a formação do precipitado azul, reincubar as amostras a 35±1°C até completar 48+2h e verificar novamente a presença de coliformes totais.

> **Nota b.1)** A incubação dos tubos de LST com os discos deve ser sempre acompanhada de um tubo inoculado com a cepa padrão glicuronidase positiva *(E. coli)* e um tubo inoculado com a cepa padrão glicuronidase negativa *(Enterobacter aerogenes)*.

c) Cálculo dos resultados. Para coliformes totais, contar todos os tubos de LST com precipitado azul insolúvel (após 30 ou 48h). Para *E. coli,* contar todos os tubos de LST com fluorescência azul sob luz UV (após 30h). Determinar o Número Mais Provável (NMP)/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

9.5. MÉTODO DO PETRIFILM™ (AOAC)
Coliformes Totais e *E. coli* em Alimentos

Método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC), incluído e descrito no Capítulo 8 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kornacki & Johnson, 2001) e no Capítulo 7 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Davidson *et al.*, 2004).

Petrifilm™ (3M Company) é uma modificação da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas, composto por dois filmes estéreis reidratáveis, impregnados pelo meio de cultura e por substâncias geleificantes solúveis em água fria. A inoculação é feita no filme inferior que, depois de inoculado, é coberto com o filme superior. O inóculo é espalhado com um difusor de plástico, por leve pressão manual e, depois da solidificação do gel, as placas são incubadas para desenvolvimento de colônias.

A AOAC validou vários tipos de petrifilm para coliformes totais e *E. coli*, com diferentes escopos de aplicação: Petrifilm Coliform Count Plate (AOAC Official Methods 991.14, 986.33 e 989.10), para coliformes totais em alimentos, Petrifilm High Sensitivity Coliform Count Plate (AOAC Official Method 996.02), para coliformes totais em produtos lácteos, Petrifilm Rapid Coliform Count Plate (AOAC Official Method 2000.15), para coliformes totais em alimentos e Petrifilm *E. coli* Count Plate (AOAC Official Methods 991.14 e 998.08), para coliformes totais + *E. coli* em alimentos. Em todos eles o meio de cultura base é o Vermelho Violeta Bile (VRB), seletivo para enterobactérias, suplementado com cloreto de trifeniltetrazolium (TTC), indicador que, ao sofrer redução, confere coloração vermelha às colônias, facilitando sua visualização. O meio contém lactose que, fermentada pelos coliformes ou *E. coli*, produz bolhas de gás em torno das colônias. As colônias típicas são vermelhas com bolhas de gás. No petrifilm para Coliformes + *E. coli* , o meio contém ainda BCIG, substrato cromogênico para a β-glicuronidase, que permite diferenciar *E. coli* pela formação de um precipitado azul em torno das colônias. O petrifilm de alta sensibilidade (High-Sensitivity Coliform Count Plate) permite a inoculação de volumes de 5ml e o petrifilm para contagem rápida (Rapid Coliform Count Plate) permite a obtenção do resultado em 6 a 14h.

9.5.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparação da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem de coliformes totais e *E. coli*

- Placas de Petrifilm adequada à contagem que se deseja efetuar
- Difusor plático
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado

9.5.2. PROCEDIMENTO

Observação. O procedimento abaixo é orientativo, devendo sempre ser verificadas e obedecidas as instruções do fabricante.

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2, porém, não usar diluentes contendo citrato, bissulfito ou tiossulfato, porque podem inibir o crescimento nos petrifilms. Nos casos em que esses diluentes sejam recomendados no Capítulo 2, substituir por Tampão Fosfato (PB). Após a homogeneização, retirar uma alíquota de volume conhecido e verificar o pH. Se necessário, acertar na faixa de 6,5 a 7,5 com NaOH ou HCl 1N, verificando o volume de ácido ou base consumido na correção da alíquota. Adicionar à amostra um volume proporcional da solução estéril.

b) Inoculação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e, de cada diluição, inocular 1ml (5ml no caso do petrifilm de alta sensibilidade) em uma placa de Petrifilm adequada à contagem que se deseja efetuar. Para tanto, seguir as orientações do fabricante, apresentadas a seguir: colocar a placa em uma superfície plana, levantar o filme superior e posicionar a ponta da pipeta perpendicular ao centro do filme inferior. Depositar o volume de 1ml (ou 5ml) e baixar o filme superior sobre o líquido, evitando a formação de bolhas. Posicionar o difusor plástico sobre centro do filme superior, com o lado liso para baixo. Com leve pressão, espalhar o líquido sobre todo o filme inferior. Não arrastar o difusor sobre a placa, apenas pressionar levemente. Remover o difusor e aguardar dois a cinco minutos, para a total solidificação do gel.

Nota b.1) Para a seleção das diluições, seguir as orientações do Capítulo 3, porque o Petrifilm segue o mesmo princípio da contagem em placas.

Nota b.2) O tecido de ostras, mexilhões e mariscos apresenta atividade natural de β-glicuronidase, que pode provocar falsos resultados positivos na contagem de *E. coli*. Para essas amostras não é recomendável a utilização do Petrifilm coliformes/*E. coli*.

Nota b.3) Alguns alimentos podem interferir na visualização das colônias na primeira diluição, como é o caso de café, chocolate ou ervas secas (muito escuros).

c) Incubação e contagem das colônias. Incubar as placas com o lado transparente para cima, em pilhas com não mais de 20 placas (10 placas no caso do petrifilm de alta sensibilidade), nas seguintes condições:

Petrifilm Coliformes Totais e Petrifilm Coliformes Totais Alta Sensibilidade. Incubar a 35±1°C/24±2h (32°C para produtos lácteos) e selecionar para contagem as placas com 15 a 150 colônias. Contar apenas as colônias típicas, vermelhas com bolhas de gás.

Petrifilm Coliformes Totais Rápido. Incubar a 35±1°C/6-14h (inclusive produtos lácteos) e fazer a contagem de todas as zonas amarelas presentes, indicativas de produção de gás e presuntivas de coliformes totais. Fazer a contagem definitiva com 24 horas, da mesma forma indicada para o petrifilm coliformes totais.

Petrifilm *E. coli*/Coliformes. Incubar a 35±1°C/24±2h (32°C para produtos lácteos) e selecionar para contagem as placas com 15 a 150 colônias. Contar apenas as colônias típicas, com as seguintes características: Coliformes totais, todas as colônias vermelhas, azuis ou vermelho azuladas, com bolhas de gás. *E. coli*, apenas as colônias azuis ou vermelho azuladas com bolhas de gás. Não havendo desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli* em 24 horas, reincubar as placas e repetir a contagem com 48±2 horas.

Nota c.1) Pode ser necessário umidificar a incubadora, para que não ocorra desidratação das placas. A perda de umidade, indicada pela perda de peso, não deve ser superior a 15%, após a incubação.

Nota c.2) Não contar as colônias presentes na espuma da borda do filme, pois essas não se encontram sob a ação dos agentes seletivos. Não enumerar bolhas de ar artificiais.

Nota c.3) A área de crescimento circular das placas de petrifilm é de aproximadamente 20cm². Em placas com mais de 150 colônias, a contagem pode ser estimada contando-se o número de colônias em um ou mais quadrados representativos e calculando-se a média por quadrado. Multiplicar então por 20, para determinar o número total de colônias por placa. Nas placas de alta sensibilidade (inoculação de 5ml) a área de crescimento é de aproximadamente 60cm². Multiplicar então por 60, para determinar o número total de colônias por placa.
Nota c.4) Uma vez completado o tempo de incubação, as placas podem ser congeladas (temperatura menor ou igual a -15°C) para armazenamento de até uma semana, para contagem posterior.

d) Cálculo dos resultados. Determinar o número de UFC/g ou ml multiplicando o número de colônias típicas pelo inverso da diluição (UFC/g ou ml = Nº colônias/diluição). Nas placas de alta sensibilidade considerar o volume de 5ml inoculado, no cálculo do resultado (UFC/g ou ml = Nº colônias/5 x diluição).

9.6. MÉTODO ISO 7251:2005
Coliformes Termotolerantes Presuntivo para *E. coli* em Alimentos

Método da International Organization for Standardization, aplica-se a todos os alimentos destinados ao consumo humano, às rações animais e à amostras do ambiente de fabricação ou manipulação de alimentos.

9.6.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada Tamponada (BPW) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada Tamponada (BPW) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml
- Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem de coliformes termotolerantes

- Tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durhan
- Tubos de Caldo *E. coli* (EC) com tubos de Durhan
- Cepa padrão positiva (cultura de *E. coli* com 24 horas)
- Cepa padrão negativa (cultura de *E. aerogenes* com 24 horas)
- Estufa incubadora regulada a 37±1°C com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 44±1°C com termômetro calibrado

Contagem de presuntiva *E. coli*

- Tubos de Caldo Triptona 1%
- Reagente de Kovacs para teste de indol
- Estufa incubadora regulada a 44±1°C com termômetro calibrado

9.6.2. PROCEDIMENTO

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Preparação das amostras e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Teste presuntivo. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) por diluição, adicionando 1ml da diluição por tubo com 9 ml de LST. Incubar os tubos de LST a 37±1°C/24±2h e observar se há crescimento com produção de gás. Em caso positivo (crescimento e produção de gás), passar aos itens subseqüentes. Em caso negativo (crescimento e/ou produção de gás), reincubar até completar 48±2h e repetir a leitura, passando para os itens subseqüentes em caso de crescimento com produção de gás.

> **Nota b.1)** No exame de moluscos e crustáceos (ostras, mexilhões e mariscos, camarão, etc), utilizar uma série de cinco tubos e incubar por 48±2h, sem leitura com 24 h.
>
> **Nota b.2)** Algumas amostras de produtos lácteos (ex. caseína), podem provocar aderência dos tubos de Durham no fundo do tubo de ensaio. Nesses casos, havendo crescimento após 48±2h, passar aos itens subseqüentes, mesmo que não seja observada produção de gás.

c) Contagem de coliformes termotolerantes. A partir dos tubos de LST com produção de gás, transferir uma alçada bem carregada de cada cultura para tubos de Caldo *E. coli* (EC). Incubar por 24±2h em banho-maria ou estufa incubadora a 44±1°C e observar se há crescimento com produção de gás. Em caso negativo (crescimento e/ou produção de gás), reincubar até completar 48±2h e repetir a leitura.

> **Nota c.1)** No exame de moluscos e crustáceos (ostras, mexilhões e mariscos, camarão, etc), incubar por apenas 24±2h.
>
> **Nota c.2)** A incubação dos tubos de EC deve ser sempre acompanhada de um tubo inoculado com a cepa padrão positiva (*Escherichia coli*) e um tubo inoculado com a cepa padrão negativa (*Enterobacter aerogenes*). Todos os tubos devem permanecer mergulhados na água, até uma altura superior à superfície do meio de cultura (caso o banho maria seja utilizado).

d) Contagem presuntiva de *E. coli*. De cada tubo de EC com crescimento e produção de gás, inocular uma alçada em tubos com 5ml de Caldo Triptona 1%, para teste de indol. Pré-aquecer os tubos a 44 ºC antes da inoculação. Incubar os tubos a 44±1°C/48±2h e, após a incubação, adicionar 0,5 ml de Reagente de Kovacs para teste de indol a cada tubo. O desenvolvimento de um anel vermelho violeta na superfície do meio de cultura, após um minuto, indica a presença presuntiva de *E. coli*. Caso haja interesse na confirmação definitiva de *E. coli*, podem ser usados os procedimentos descritos no item 9.2.2.f (IMViC).

e) Cálculo e expressão dos resultados. Para a contagem presuntiva de *E. coli*, anotar o número de tubos de Caldo Triptona 1% com teste de indol positivo e determinar o Número Mais Provável (NMP)/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

9.7. MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO (COLILERT®) AOAC 991.15 Coliformes Totais *E. coli* em Água

Método da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), descrito na 18ª Edição do *Official Methods of Analysis of AOAC International* (Horwitz & Latimer, 2005). Também foi adotado na 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Eaton *et al.*, 2005).

O método validado pela AOAC foi o da Idexx Laboratories Inc., comercializado como COLILERT®. O *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Eaton *et al.*, 2005),entretanto, não indica uma marca específica do substrato, podendo ser usada qualquer marca, desde que comprovado desempenho equivalente.

9.7.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Substrato cromogênico COLILERT® ou equivalente
- Proveta estéril para medida de volume de 100ml da amostra de água
- Pipetas estéreis de 10 ou 20ml para transferência de volumes de 10ml da amostra com substrato
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado

9.7.2. PROCEDIMENTO

Observação. O procedimento abaixo é orientativo, devendo sempre ser verificadas e obedecidas as instruções do fabricante do substrato cromogênico.

Teste de presença/ausência em 100ml. Transferir 100ml da amostra para um frasco ou bolsa estéril. Para amostras de água clorada, enviadas ao laboratório sem a prévia neutralização do cloro, utilizar frascos ou bolsas estéreis contendo tabletes de tiossulfato de sódio, para a neutralização. Abrir o envelope ou ampola contendo a quantidade pré-distribuída do substrato de cultura, disponível comercialmente já esterilizado. Assepticamente, adicionar o substrato aos 100ml de amostra de água. Algumas partículas podem permanecer indissolúveis, mas isso não afetará o desempenho do teste. Incubar a 35±1°C/24h e observar o desenvolvimento de cor amarela, confirmativa da presença de coliformes totais. Observar também, sob lâmpada de luz ultravioleta (4 a 6w), ondas longas (366nm), a ocorrência de fluorescência azulada, confirmativa da presença de *E. coli*.

> **Nota)** O *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) recomenda, em caso de resultado duvidoso em 24h, prolongar a incubação por quatro horas adicionais.

Quantificação pela técnica dos tubos múltiplos (NMP). Se houver interesse na determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais ou *E.coli* na amostra, dividir o volume de 100 ml (já contendo o substrato de cultura) em 10 alíquotas de 10ml, transferidos para 10 tubos de ensaio estéreis vazios. Homogeneizar bem a amostra, por agitação, antes da tomada das alíquotas. Incubar os tubos a 35±1°C/24 h e proceder à leitura dos resultados da mesma forma descrita para o teste de presença/ausência.

> **Nota**) Alguns vidros utilizados na manufatura de tubos de ensaio podem apresentar uma fluorescência natural sob luz UV. Por essa razão, deve-se verificar a ausência de fluorescência em todos os tubos destinados ao ensaio quantitativo.

9.8. REFERÊNCIAS

AOAC, 2009. Rapid Methods Adopted as AOAC Official Methods. Disponível no site <http://www.aoac.org/vmeth/oma_testkits.pdf>, acesso em 28/08/09.

BRENNER, D.J. & FARMER III, J.J. Family I. *Enterobacteriaceae*. In: BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005. p.587-607.

DAVIDSON, P.M., ROTH, L.A., GAMBREL-LENARZ, S.A. Coliform and other indicator bacteria. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 7, p.187-226.

DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W. & GREENBERG, A.E. (Eds). **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed**. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005.

FENG, P.C.S. & HARTMAN, P.A. Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Eschericihia coli*. **Applied and Environmental Microbiology 43**:1320-1329, 1982.

HORWITZ, W & LATIMER, G. W. (eds.). **Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Ed**. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2005.

HUNT, M.E. & RICE, E.W. Microbiological examination. In: EATON *et al.* (Eds), **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed**. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000, Section 9221, p.9.49-9.58.

ISO 7251. Microbiology of food and animal stuffs - **Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* - Most probable number technique. 3rd ed**. The International Organization for Standardization, 2005.

KORNACKI, J.L. & JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 8, p.69-82.

WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2004.

Capítulo 10

Staphylococcus aureus

10.1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica, cuja doença transmitida por alimentos (DTA) é classificada pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) no grupo de risco III, que inclui as doenças "de perigo moderado, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou seqüelas, com sintomas auto limitados mas que causam severo desconforto".

Principais características de *S. aureus*

As informações abaixo são dos livros *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook* "*Bad Bug Book*" (FDA/CFSAN, 2005) e *Microorganisms in Foods 5 – Microbiological Specifications of Food Pathogens* (ICMSF, 1996).

A doença transmitida por *S. aureus* é uma intoxicação, provocada pela ingestão de toxinas formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação das células. As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes à cocção e às enzimas proteolíticas. A ingestão de uma dose menor que 1µg pode provocar os sintomas da intoxicação e essa quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* alcança valores acima de 10^6 UFC/g de alimento.

Os sintomas são evidenciados entre duas a seis horas depois da ingestão, incluindo náusea, vômitos, cólicas, prostração, pressão baixa e queda de temperatura. A recuperação ocorre em torno de dois dias e as complicações ou morte são raras. O diagnóstico é fácil, especialmente quando há um surto com predomínio de sintomas gastrointestinais superiores, com intervalo curto entre a ingestão e o início dos sintomas.

Como todos os *Staphylococcus*, as cepas de *S. aureus* são cocos Gram positivos que, caracteristicamente, se dividem em mais de um plano, formando aglomerados de células que lembram um cacho de uvas. São anaeróbios facultativos e catalase positivos, distinguindo-se dos demais estafilococos através de três testes: o teste de coagulase (coagulação do plasma sanguíneo) positivo, o teste de DNAse termoestável (nuclease resistente ao calor) positivo e o teste de redução do telurito, também positivo. Algumas outras espécies de *Staphylococcus* podem produzir pequenas quantidades de coagulase, razão pela qual apenas as cepas fortemente positivas nesse teste são consideradas como *S. aureus.*

S. aureus não é resistente ao calor, sendo facilmente destruído na pasteurização ou na cocção de alimentos. As toxinas, ao contrário, são altamente resistentes, suportando tratamentos térmicos tão severos como a esterilização de alimentos de baixa acidez.

A temperatura ótima de crescimento de *S. aureus* é de 35 a 40°C, com limites entre 7 e 45°C. A produção de toxinas ocorre numa faixa mais limitada de temperatura. Os limites de pH para crescimento estão entre 4,2 e 9,3 e a atividade de água mínima é de 0,85, suportando concentrações de até 25% de NaCl. Sob esse aspecto, é uma bactéria atípica entre os patógenos de origem alimentar, que normalmente não crescem em atividade de água menor do que 0,92.

O reservatório de *S. aureus* são os seres humanos e os animais de sangue quente, ocorrendo nas vias nasais, garganta, pele e cabelos de 50% ou mais indivíduos humanos saudáveis. Os manipuladores são a fonte mais freqüente de contaminação, embora os equipamentos e superfícies do ambiente também possam contaminar os alimentos. O ubere infectado de vacas leiteiras são uma fonte comum de contaminação do leite.

Alimentos já incriminados em surtos incluem carnes e produtos cárneos (principalmente presuntos), produtos lácteos e derivados (principalmente queijos), aves, ovos, saladas mistas com vários ingredientes (ovos, atum, frango, batata), macarrão, patês, molhos, tortas de cremes, bombas de chocolate e sanduíches com recheios. São de maior risco os alimentos muito manipulados durante o preparo e/ou os que permanecem à temperatura ambiente depois da preparação.

Métodos de análise

A contagem de *S. aureus* em alimentos pode ser feita com três objetivos diferentes: confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, verificar se o alimento é uma fonte potencial de *S. aureus* ou indicar contaminação pós-processo (que geralmente se deve ao contato com manipuladores ou com superfícies inadequadamente sanitizadas). Em cada um destes casos, o sucesso das análises depende da seleção de um método adequado ao número de células presente e às condições de injúria das células. De maneira geral, alimentos envolvidos em surtos apresentam uma grande população de *S. aureus,* não exigindo métodos particularmente sensíveis. É importante ressaltar, entretanto, que alimentos mantidos em condições favoráveis ao crescimento e, depois, submetidos a aquecimento, podem não apresentar células viáveis, mas, ainda assim, conter toxinas ativas (Lancette & Bennett, 2001). Na enumeração como indicador, o número de células geralmente é baixo, exigindo métodos mais sensíveis, principalmente se *S. aureus* não for a espécie predominante no alimento.

Há vários métodos disponíveis para a contagem de *S. aureus,* com sensibilidade variável tanto em função das características seletivas/diferenciais utilizadas na formulação dos meios, como em função da técnica de contagem propriamente dita (direta em placas ou pelo Número Mais Provável). Eventualmente, dependendo do objetivo da análise e das condições de injúria impostas às células, pode ser aconselhável a aplicação de um simples teste de presença/ausência, com uma etapa de pré-enriquecimento não seletivo, que garanta a reparação das injúrias.

As principais características seletivas utilizadas no isolamento de *S. aureus* são a habilidade de crescer na presença de NaCl (5,5 a 10%), telurito de potássio (0,0025 a 0,05%), cloreto de lítio (0,01 a 0,05%), glicina (0,12 a 1,26%) e polimixina (40mg/l). As características diferenciais são a capacidade de reduzir o telurito de potássio (produzindo colônias pretas em meios sólidos), a capacidade de hidrolisar a gema de ovo, a capacidade de utilizar o manitol e de crescer a 42-43°C em condições seletivas, a atividade de coagulase e a atividade de termonuclease. Há vários meios disponíveis para a contagem direta em placas, combinando uma ou mais características seletivas/diferenciais, como o Ágar Manitol Sal, o Ágar Vogel-Johnson, o Ágar Azida Gema de Ovo, o Ágar Fenolftaleína Fosfato de Polimixina, o Ágar Leite Sal, o Ágar Telurito Glicina, o Ágar Telurito Polimixina Gema de Ovo e o Ágar *Staphylococcus* 110. De maneira geral, estes meios não devem

ser utilizados para alimentos em que se espera a presença de células injuriadas, pois são considerados restritivos para a reparação das injúrias.

O meio mais amplamente utilizado é o Ágar Baird-Parker (BP), que combina o telurito de potássio (0,01%), a glicina (1,2%) e o cloreto de lítio (0,5%), como agentes seletivos, e a redução do telurito e a hidrólise da gema de ovo, como características diferenciais. Adicionalmente, o meio contém 1% de piruvato de sódio, considerado excelente para a reparação de células injuriadas, porque evita o acúmulo de peróxido de hidrogênio (tóxico para as células). Pode ser utilizado para o plaqueamento direto de alimentos processados ou "in natura", tanto na enumeração com finalidades indicativas como na enumeração com finalidades de saúde pública. Por outro lado, o BP, bem como todos os demais meios citados, não é capaz de suprimir completamente o crescimento de competidores de *S. aureus*. Outras espécies não patogênicas do gênero *Staphylococcus* podem crescer, produzindo colônias semelhantes, havendo a necessidade de submeter as colônias típicas ao teste de coagulase, para confirmação.

Outros métodos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) são os "kits" analíticos descritos no Quadro 10.1.

Quadro 10.1. "Kits" analíticos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a contagem de *S. aureus* em alimentos.

Fabricante	Nome do "kit	Validação	Aplicação
3M Microbiology Products	Petrifilm™ Rapid *S. aureus* Count Plate	AOAC Official Method 2001.05	Alimentos
3M Microbiology Products	Petrifilm™ StaphExpress Count Plate	AOAC Official Methods 2003.07 e 2003.08	Alimentos processados e preparados, produtos lácteos selecionados

Fonte: AOAC, 2005. Method news. Disponível no site <http://aoac.org/vmeth/newsmtd.htm>, acesso em 24/02/06.

10.2. MÉTODO DE CONTAGEM DIRETA EM PLACAS (*S. aureus* coagulase positivo)

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 39 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Lancette & Bennett, 2001) e no Capítulo 5 da 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Henning *et al*., 2004). Recomendado para alimentos em que se espera contagens de *S. aureus* acima de 100 UFC/g.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

10.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem direta em placas

- Placas com Ágar Baird-Parker (BP)
- Estufa incubadora regulada a 35-37ºC com termômetro calibrado

Confirmação

- Tubos com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)
- Tubos com Ágar Tripticase de Soja (TSA) inclinados
- Coagulase Plasma-EDTA ou “kit” de teste de aglutinação em látex
- Placas ou lâminas com Ágar Azul de Toluidina DNA
- Peróxido de hidrogênio 3%
- Tampão Fosfato Salina 0,02M
- Lisostafina
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% de glicose
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% de manitol
- Óleo mineral estéril
- Reagentes para coloração de Gram
- Estufa incubadora regulada a 35-37ºC com termômetro calibrado

10.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise de *S. aureus* pelo método de contagem direta em placas encontra-se descrito na Figura 10.1.

a) Preparação da amostra e diluições seriadas

Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2. Para a análise de produtos lácteos o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* recomenda unidade analítica de 50g.

b) Inoculação

Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular 0,1ml de cada diluição na superfície de placas de Ágar Baird-Parker (BP), previamente preparadas e secadas. Espalhar o inóculo com uma alça de Drigalski, das placas de maior para as placas de menor diluição, até que todo o excesso de líquido seja absorvido. Se as contagens estimadas de *S. aureus* na amostra forem menores do que 100 UFC/g ou ml, inocular 1ml da amostra ou da primeira diluição, distribuindo o volume por quatro placas, três com 0,3ml e uma com 0,1ml.

c) Incubação e contagem das colônias presuntivas

Aguardar que as placas sequem completamente e incubar, invertidas, a 35-37ºC/45-48h. Selecionar para a contagem as placas com 20 a 200 colônias, exceto nos casos em que as colônias típicas só estejam presentes em placas mais cheias. Contar apenas as colônias típicas de *S. aureus*, que são circulares, pretas ou cinza escuras, com 2-3mm de diâmetro (em placas cheias são menores, com cerca de 1,5mm), lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca. Colônias isoladas de alimentos congelados ou desidratados por longos períodos de tempo podem ser menos escuras e apresentar uma aparência rugosa e seca. Eventualmente, colônias atípicas podem apresentar-se cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos. Se a placa apresentar colônias suspeitas de mais de um tipo, contar cada tipo separadamente e anotar o resultado.

Nota c.1) Incubação a 35±1ºC no *Standard Methods for the Examination of Dairy Products.*

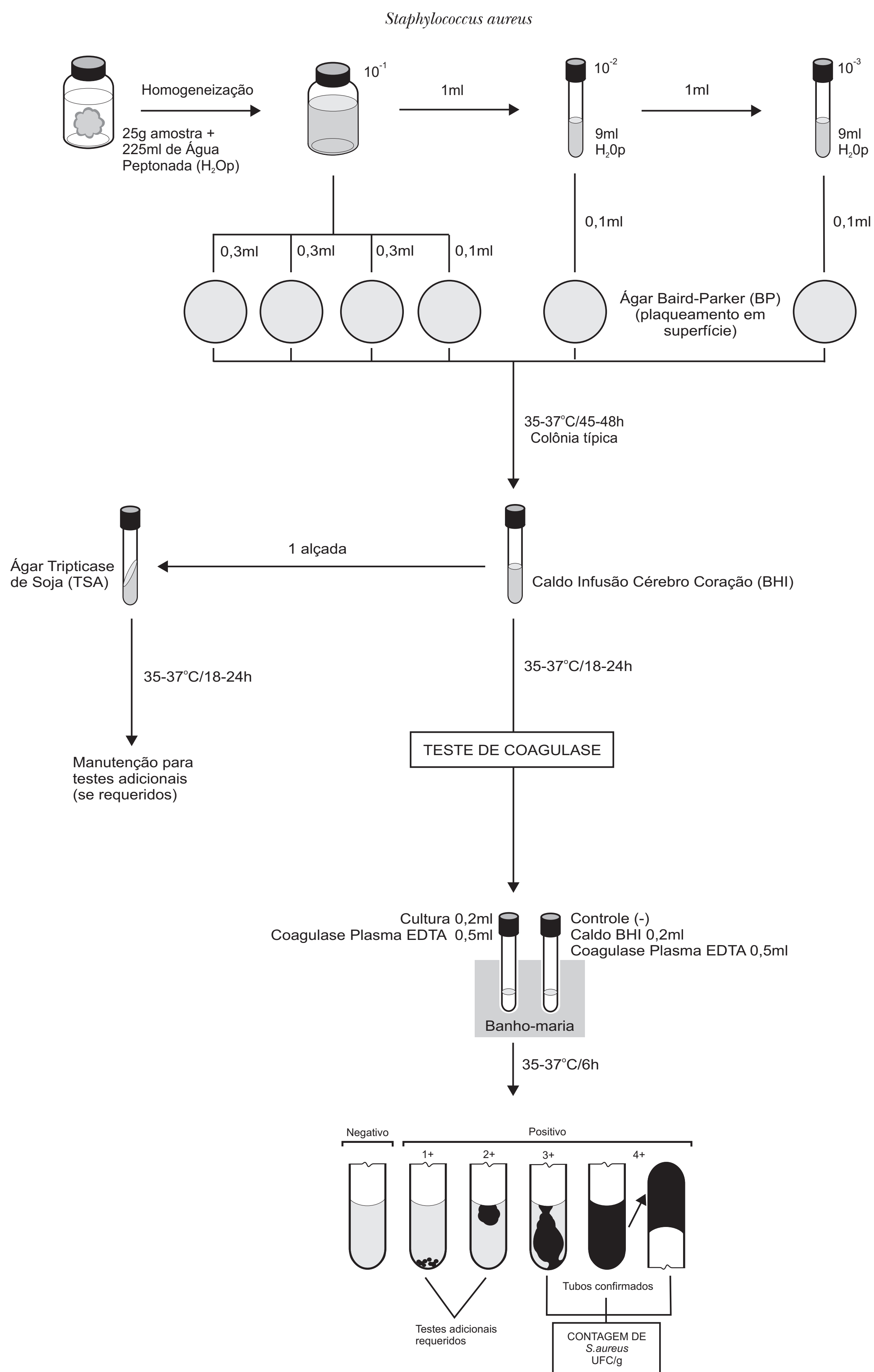


Figura 10.1. Esquema de análise de *S. aureus* pelo método de contagem direta em placas (Lancette & Bennett, 2001).

d) Confirmação das colônias típicas

Selecionar no mínimo cinco colônias típicas para o teste de coagulase e, havendo menos do que cinco, tomar todas. Se a placa apresentar colônias suspeitas de mais de um tipo, selecionar pelo menos duas de cada tipo.

Transferir cada colônia para tubos de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), emulsionar bem a massa de células com o caldo e transferir uma alçada de cada tubo de BHI para tubos com Ágar Tripticase de Soja (TSA) inclinados. Incubar todos os tubos a 35-37°C/18-24h. Reservar a cultura em TSA para testes adicionais, se necessários.

d.1) Teste de coagulase. Transferir 0,2ml de cada cultura obtida em BHI, para um tubo estéril de 10x100mm. Adicionar aos 0,2ml de cultura, 0,5ml de Coagulase Plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA). Misturar com movimentos de rotação, sem agitar os tubos, para não interferir na coagulação. Incubar a 35-37°C e observar periodicamente, durante seis horas, se há formação de coágulo. Ao observar os tubos, não agitar para evitar rompimento do coágulo. Ao final das seis horas, a coagulação completa de todo o conteúdo do tubo, formando um coágulo firme que não se rompe quando o tubo é virado para baixo, é considerada reação positiva de nível 4+ (Figura 10.1). A coagulação da maior parte do conteúdo do tubo, formando um coágulo grande e organizado, é considerada reação positiva de nível 3+. A formação de um pequeno coágulo organizado ou de pequenos coágulos desorganizados caracterizam reações positivas de nível 2+ ou 1+, respectivamente. As reações de nível 3+ ou 4+ são confirmativas da presença de *S. aureus* coagulase positivo. Culturas com reações positivas de nível 1+ ou 2+ devem ser submetidas a testes adicionais (coloração de Gram, catalase, termonuclease e sensibilidade à lisostafina), para confirmação.

Notad.1.1) O *Compendium* considera a reação de nível 3+ confirmativa, mas o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Henning *et al.*, 2004) e o *Bacteriological Analytical Manual* (Bennett & Lancette, 2001) só consideram a reação de nível 4+.

Nota d.1.2) O teste de coagulase pode ser substituído pelo teste de aglutinação em latex, utlizando "kits" disponíveis comercialmente. Esse teste detecta o fator aglutinante (clumping factor) presente nas células de *S. aureus*, que liga-se ao fibrinogênio ou fibrina do plasma humano ou de coelho, resultando na aglutinação das células. Para a realização do teste, seguir o procedimento recomendado pelos fabricantes.

d.2) Teste de catalase. A partir dos tubos de TSA inclinados, emulsionar uma alçada da cultura em uma gota de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) 3%, em uma lâmina de vidro. Observar se ocorre borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo). As cepas de *S. aureus* são catalase positivas.

d.3) Teste de termonuclease. A partir do caldo BHI, transferir uma porção da cultura para um tubo de 10x100mm e ferver em banho-maria por 15 minutos. Inocular a cultura fervida e resfriada nos orifícios previamente preparados em lâminas de Ágar Azul de Toluidina DNA. Utilizar uma das perfurações para uma cepa padrão termonuclease positiva (*S. aureus* ATCC 12.600) e outra para uma cepa padrão negativa (*S. epidermidis* ATCC 14.990). Colocar as lâminas dentro de placas de Petri recobertas com papel de filtro umidificado (câmara úmida) e selar as placas com fita crepe. Incubar a 35-37°C/4h ou a 50°C/2h e observar, após a incubação, se há formação de um halo róseo, estendendo-se por cerca de 1mm em redor das perfurações inoculadas (teste positivo), ou a ausência desse halo, indicativa de teste negativo. As cepas de *S. aureus* produzem termonuclease.

d.4) Teste de sensibilidade à lisostafina. A partir do caldo BHI, transferir 0,1ml da cultura para um tubo estéril de 10x100mm com 0,1ml de solução de lisostafina (dissolvida em Tampão Fosfato Salina 0,02M com 2% de NaCl) na concentração de 25µg/ml. Preparar um tubo com uma cepa padrão positiva (*S. aureus* ATCC 12.600), um tubo com uma cepa padrão negativa (*Kocuria varians* ATCC 15.306, anteriormente classificado como *Micrococcus varians*) e um tubo "branco" com 0,1ml da cultura suspeita e 0,1ml de Tampão Fosfato 0,02M com 2% de NaCl (sem lisostafina). Incubar os tubos a 37+1°C/2h e observar se a suspensão perde a turbidez (teste positivo) ou permanece turva (teste negativo). As células de *S. aureus* geralmente são lisadas pela lisostafina (sensíveis), apresentando resultado positivo nesse teste.

Nota d.4.1) Lisostafina dissolvida em Tampão Fosfato 0,02M com 1% de NaCl no *Standard Methods for the Examination of Dairy Products.*

d.5) Teste de utilização anaeróbica da glicose e do manitol. A partir do tubo de TSA, transferir uma alçada com inóculo pesado da cultura para um tubo de Caldo Púrpura Base com 0,5% de glicose e um tubo de Caldo Púrpura Base com 0,5% de manitol, previamente desaerados. Incluir um tubo inoculado com uma cepa padrão positiva (*S. aureus* ATCC 12.600), um tubo com uma cepa padrão negativa (*Kocuria varians* ATCC 15.306) e um tubo "branco" não inoculado. Cobrir com uma camada de 2,5mm de óleo mineral estéril e incubar por cinco dias a 37°C. Observar a ocorrência de viragem ácida para amarelo (teste positivo) ou não (teste negativo). *S. aureus* utiliza a glicose e, usualmente, também o manitol anaerobicamente. *K. varians* não.

e) Interpretação e cálculo dos resultados

Considerar com *S. aureus* todas as culturas com reação de coagulase de níveis 3 e 4, ou as culturas com reação de coagulase de níveis 1 e 2, Gram positivas em forma de cocos em cachos, com as características típicas apresentadas no Quadro 10.2.

Quadro 10.2. Características típicas de *S. aureus* em comparação com *S. epidermidis* e *Micrococcus* sp.

Característica	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*Micrococcus*
Catalase	+	+	+
Coagulase	+	-	-
Termonuclease	+	-	-
Lisostafina	Sensível	Sensível	Resistente
Utilização anaeróbica da glicose	+	+	-
Utilização anaeróbica do manitol	+	-	-

Calcular o número de UFC/g ou ml em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

Exemplo 1: Diluição 10^{-2}, 30 colônias típicas, cinco submetidas à confirmação, três confirmadas (60%). UFC/g ou ml = $30x10^2x10x0,6 = 1,8x10^4$.

Exemplo 2: Diluição 10^{-2}, 30 colônias suspeitas (20 de um tipo e 10 de outro tipo), 10 submetidas à confirmação (cinco do primeiro tipo e cinco do segundo tipo), sete confirmadas (cinco do primeiro tipo = 100% e 2 do segundo tipo = 40%). UFC/g ou ml = $(20x10^2x10x1) + (10x10^2x10x0,4) = 2,4x10^4$.

10.3. MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 39 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Lancette & Bennett, 2001).

Este método é recomendado para alimentos com baixa contagem de *S. aureus* e alta contagem de microrganismos competidores. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

10.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem

- Tubos com 10ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB) suplementado com 10% de NaCl e 1% de piruvato de sódio
- Placas de Ágar Baird Parker (BP)
- Estufa incubadora regulada a 35-37°C com termômetro calibrado

Confirmação

- Os mesmos itens requeridos no item 10.2.1.

10.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise de *S. aureus* pelo método do NMP encontra-se descrito na Figura 10.2.

a) Preparação das amostras, inoculação e incubação. Para a preparação das amostras e diluições decimais seriadas, seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2. Inocular três porções de 1ml das três primeiras diluições da amostra, em uma série de três tubos com 10ml de caldo Caldo Tripticase de Soja (TSB), suplementado com 10% de NaCl e 1% piruvato de sódio. Incubar os tubos a 35-37°C/48±2h e observar se ocorre crescimento.

b) Confirmação. A partir de cada tubo com crescimento, estriar uma alçada da cultura em placas de Ágar Baird-Parker (BP), por estrias de esgotamento. Incubar as placas a 35-37°C/48±2h e observar a presença de colônias típicas, do tipo descrito no item 10.2. Na ausência de colônias típicas, considerar o tubo como não confirmado. Na presença de colônias típicas, selecionar uma ou mais colônias de cada placa e submeter à confirmação, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 10.2.

c) Cálculo dos resultados. Anotar o número de tubos confirmados e determinar o Número Mais Provável (NMP)/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

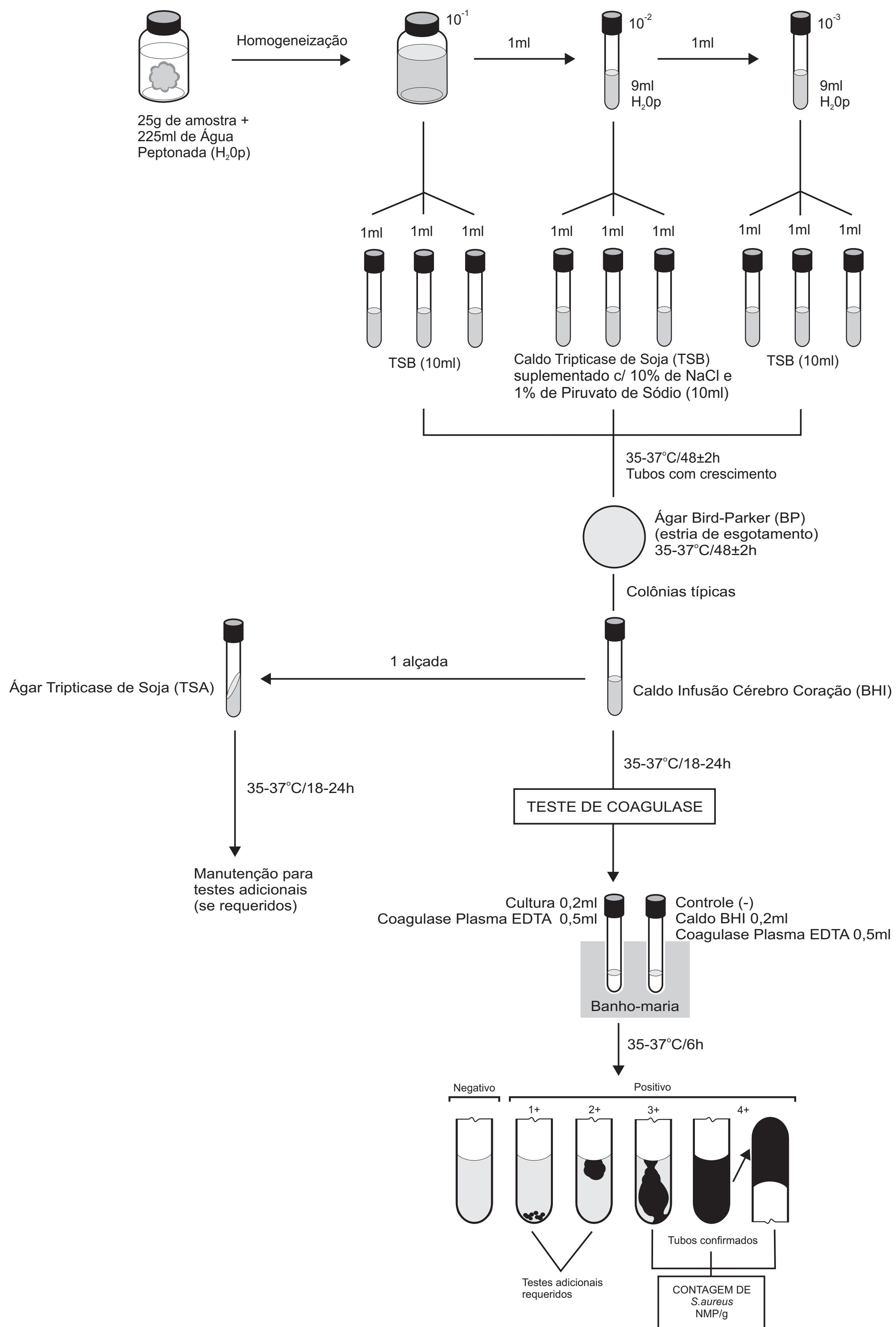


Figura 10.2. Esquema de análise de *S. aureus* pelo método do NMP (Lancette & Bennett, 2001).

10.4. TESTE DE PRESENÇA/AUSÊNCIA

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 39 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Lancette & Bennett, 2001).

Este método objetiva verificar a presença de *S. aureus* em alimentos processados, com baixa contagem e provável incidência de células injuriadas.

10.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Teste de presença/ausência

- Frascos com 50ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB) em concentração dupla
- Frascos com 100ml de Caldo TSB (concentração normal) suplementado com 20% de NaCl
- Placas de Ágar Baird Parker (BP)
- Estufa incubadora regulada a 35-37ºC com termômetro calibrado

Confirmação

- Os mesmos itens requeridos no item 10.2.1.

10.4.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral do teste de presença/ausência de *S. aureus* encontra-se descrito na Figura 10.3.

a) Pré-enriquecimento. Para a preparação das amostras e diluições decimais seriadas, seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2. Para aumentar o limite de detecção do método, pode-se inocular diferentes quantidades da amostra na primeira diluição (50g/450ml diluente ou 100g/900ml diluente, etc.). Transferir 50ml da primeira diluição para 50ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB) em concentração dupla e incubar a 35-37ºC por 3 horas.

b) Enriquecimento seletivo. Após a incubação por três horas, adicionar ao Caldo TSB mais 100ml de Caldo TSB (em concentração normal) suplementado com 20% de NaCl. Incubar a 35-37ºC por 24±2 horas.

c) Confirmação da presença/ausência. Transferir duas porções de 0,1ml do caldo de enriquecimento seletivo para a superfície de duas placas de Ágar Baird-Parker (BP). Espalhar o inóculo com uma alça de Drigalski, aguardar a completa absorção do líquido e incubar as placas invertidas, a 35-37ºC/48±2h. Observar a presença de colônias típicas de *S. aureus,* do tipo descrito no item 10.2, e considerar a ausência de colônias típicas como indicação da ausência de *S. aureus* na quantidade de amostra inoculada. Havendo colônias típicas, selecionar duas ou mais colônias de cada placa e submeter à confirmação, de acordo com o procedimento descrito no item 10.2. Havendo confirmação das colônias, apresentar o resultado como presença de *S. aureus* na quantidade de amostra inoculada.

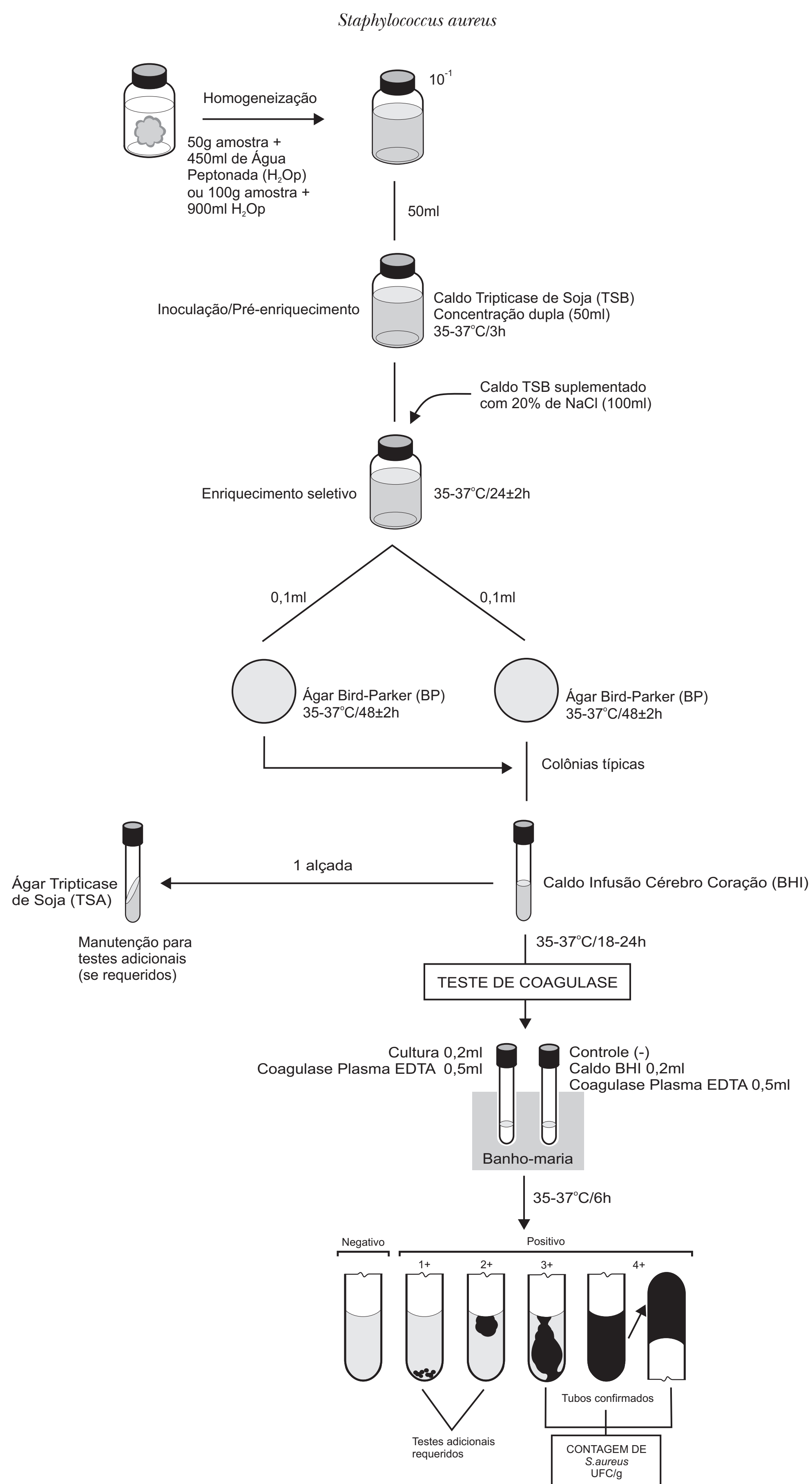


Figura 10.3. Esquema geral do teste de presença/ausência de *S. aureus* (Lancette & Bennett, 2001).

10.5. REFERÊNCIAS

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2005. **Method news**. Disponível no site da AOAC <http://aoac.org/vmeth/newsmtd.htm>, acesso em 24/02/06

BENNETT, R.W. & LANCETTE, G.A. *Staphylococcus auresu.* In: U S Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Manual**, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>, acesso em 13/04/06. Chapter 12, revised January 2001.

FDA/CFSAN. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook "Bad Bug Book"**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, December 2, 2005. http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html.

HENNING, D.R., FLOWERS, R., REISER, R., RYSER, E.T. Pathogens in milk and milk products. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 5, p.103-151.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. **Microrganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food pathogens**. Blackie Academic & Professional, London (ISBN 0 412 47350 X).

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. **Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management.** Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN 0 306 47262 7).

LANCETTE, G.A. & BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 39, p.387-403.

Capítulo 11

Bacillus cereus

11.1. INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é uma bactéria patogênica, cujas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são classificadas pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) no grupo de risco III, que inclui as doenças "de perigo moderado, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou seqüelas, com sintomas auto limitados mas que provocam severo desconforto".

Grupo *B. cereus*

As informações abaixo são do *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire* (Euzéby, 2003).

Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Bacillus thuringiensis, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides e *Bacillus weihenstephanensis* constituem um grupo de espécies de *Bacillus* (Grupo *B. cereus*) estreitamente relacionadas entre si e, do ponto de vista prático, dificilmente diferenciadas umas das outras. São bactérias Gram positivas, esporogênicas, anaeróbias facultativas e produzem esporos facilmente, na maioria dos meios de cultura. Cada uma dessas espécies é diferenciada de *B. cereus*, basicamente, por uma única característica.

B. anthracis e *B. cereus* são as únicas espécies do grupo patogênicas para humanos. *B. anthracis* é uma bactéria temida, devido ao alto potencial de uso como arma biológica. Provoca uma doença conhecida como carbúnculo, que atinge herbívoros (particularmente ruminantes) e pode ser transmitida para humanos, através do contato com os animais infectados. A transmissão se dá por exposição inalatória, cutânea ou gastrointestinal, atingindo principalmente profissionais de saúde animal, criadores e separadores de lã. A forma inalatória é muito grave, com sintomas iniciais inespecíficos (febre, mialgia, fadiga, sudorese) e, após dois a quatro dias dos sintomas iniciais, desconforto respiratório, choque e morte. A infecção cutânea normalmente ocorre na cabeça, braços e mãos, provocando úlceras negras e profundas, entre dois a seis dias. Geralmente não é fatal, se tratada com antibióticos. A forma gastrintestinal, rara nos países desenvolvidos, traduz-se por perturbações gerais (febre, estado de choque) e digestivas (dores abdominais, vômito, diarréia sangrenta), entre dois e sete dias. Assim como na forma inalatória, a taxa de mortalidade é elevada.

B. thuringiensis é patogênico para insetos, sendo utilizado como agente de controle biológico (bioinseticida) na agricultura, há mais de 30 anos (Valadares-Inglis *et al.*, 1998). Durante o processo de esporulação, as células produzem inclusões cristalinas (cristais parasporais), compostas por um ou mais polipeptídios (delta-endotoxinas), que são codificadas pelos genes Cry. As toxinas são ativas contra as larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, bem como

contra nematóides e ácaros (Dean, 1984). Não afetam o homem, os animais ou as plantas (Souza *et al.*, 1999).

B. mycoides apresenta morfologia de colônias característica em meios sólidos (colônias rizóides), lembrando o crescimento fúngico. A partir do ponto de inoculação, a multiplicação ocorre em cadeias de células ligadas entre si, formando longos filamentos que se projetam radialmente e se curvam para a direita ou para a esquerda (Di Franco *et al.*, 2002). As colônias têm aparência de raízes, de onde deriva o termo rizóide.

B. pseudomycoides é uma espécie nova, proposta por Nakamura (1998). É composta de um grupo de cepas de *B. mycoides*, com composição de ácidos graxos distinta. As características morfológicas, fisiológicas e de crescimento são indistinguíveis de *B. mycoides*, incluindo o crescimento rizóide em meios sólidos.

B. weihenstephanensis também é uma espécie nova, proposta por Lechner *et al.* (1998). É composta das linhagens psicrotróficas de *B. cereus*, separadas das linhagens mesófilas, que continuam na espécie *cereus*. Apresenta todas as características típicas de *B. cereus*, do qual se diferencia apenas pela capacidade de crescer entre 4 e 7ºC e não crescer a 43ºC.

Nem sempre, nos ensaios, é possível diferenciar *B. cereus* dos outros membros do Grupo, cujas principais características estão sumariadas na Tabela 11.1.

Os dados da Tabela 11.1. são do Capítulo 14 do *BAM Online* (FDA, 2001) que, assim como a 4ª Edição do *Compendium*, não tratam *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis* separadamente.

Tabela 11.1. Características das espécies do Grupo *B. cereus* (FDA, 2001).

Característica	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. mycoides*	*B. anthracis*
Coloração de Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Motilidade	+/-	+/-	-	-
Redução do nitrato	+	+	+	+
Decomposição da tirosina	+	+	+/-	d
Resistência à lisozima	+	+	+	+
Reação de gema de ovo	+	+	+	+
Utilização anaeróbica da glicose	+	+	+	+
Voges-Proskauer (VP)	+	+	+	+
Ácido a partir de manitol	-	-	-	-
Hemólise	+	+	+	d
Outras características conhecidas	Produz enterotoxinas	Produz cristais de endotoxinas	Crescimento rizóide	Patogênico para o homem e outros animais

+ = 90-100% das cepas positivas, +/- = 50-50% das cepas positivas, - = 90-100% das cepas negativas, d = maioria das cepas negativas.

Principais características de *B. cereus*

As informações abaixo são dos livros *Bacteriological Analytical Manual* (*BAM Online*) (FDA, 2001), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Bennett & Belay, 2001) e *Microorganisms in Foods 5 – Microbiological Specifications of Food Pathogens* (ICMSF, 1996). Nenhuma dessas referências separa *B. weihenstephanensis* de *B. cereus*.

As cepas de *B. cereus* são catalase positivas e, caracteristicamente, capazes de decompor a tirosina. A temperatura ótima de crescimento é de 30 a 40ºC, com mínima de 4ºC e máxima de 55ºC. O pH ótimo encontra-se entre 6,0 e 7,0, com mínimo de 5,0 e máximo de 8,8. A atividade de água mínima é de 0,93.

Os esporos de *B. cereus* apresentam resistência térmica similar aos de outros esporos de bactérias mesófilas, com valor D_{121^oC} entre 0,03 e 2,35min e valor z entre 7,9 e 9,9ºC (em tampão fosfato 0,05M). Em caldo de arroz a 100ºC, resistem por 4,2 a 6,3min.

As doenças provocadas por *B. cereus* são intoxicações, resultantes da ingestão de toxinas formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação das células. Dois tipos de doenças são conhecidas:

Uma é a síndrome diarreica, caracterizada por dores abdominais e diarréia, com período de incubação de oito a 16 horas e sintomas entre 12 e 24 horas. É provocada pela toxina diarreica, uma proteína termossensível, inativada por aquecimento a 56ºC/5min.

A outra é a síndrome emética, caracterizada por náusea e vômito, entre uma e cinco horas depois do consumo do alimento contaminado. A diarréia não é o sintoma predominante nesse caso, mas pode ocorrer. É provocada pela toxina emética, um pequeno peptídeo altamente resistente ao calor, que pode suportar o cozimento e, também, tratamentos térmicos muito mais severos, como 126ºC por 90min ou 120ºC por mais de uma hora. A temperatura ótima para a produção da toxina emética em arroz é de 25-30ºC.

A presença de *B. cereus* em alimentos não representa risco à saúde, a menos que possa se multiplicar e atingir populações maiores do que 10^5 células viáveis por grama. Os alimentos mais freqüentemente implicados em surtos são produtos cozidos ou contendo ingredientes cozidos, particularmente os ricos em amido ou proteínas, como arroz, massas, vegetais, sopas, saladas de vegetais, brotos de sementes, pudins e carnes. O cozimento ativa os esporos e, se a refrigeração não for adequada, esses esporos podem germinar e produzir as toxinas.

Métodos de análise

A contagem de *B. cereus* em alimentos pode ser feita pelo método de plaqueamento direto, mais comum, ou pelo método do número mais provável, recomendado quando se esperam contagens abaixo de 1000 UFC/g.

No plaqueamento direto, o meio mais utilizado é o Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP), que combina a polimixina como agente seletivo e a gema de ovo e o manitol, como agentes diferenciais. A produção de colônias com uma forte reação de gema de ovo (atividade de lecitinase), caracterizada por um grande halo de precipitação, é típica dos bacilos do Grupo *B. cereus*. A não fermentação do manitol confere ao halo em volta da colônia uma coloração rósea leitosa.

Outro meio recomendado é o KG, que apresenta a mesma sensibilidade e seletividade do MYP, mas é bem menos utilizado. As colônias são idênticas às do MYP, mas não apresentam a coloração, porque o meio não contém manitol. Formulado para estimular a formação de esporos livres em 20-24h de incubação, permite a imediata confirmação das colônias (diretamente das placas de contagem), através da coloração de esporos e de glóbulos de lipídios intracelulares (teste confirmatório rápido de Holbrook & Anderson). Para aplicar esse teste às colônias obtidas em MYP, é necessário repicar a cultura em Ágar Nutriente. Dessa forma, o KG é uma alternativa mais rápida na contagem de *B. cereus*. Outra vantagem do KG é que outras espécies de *Bacillus* que produzem lecitinase, como *B. polymyxa*, são incapazes de formar lecitinase nesse meio, nutricionalmente pobre.

A confirmação das colônias típicas inclui dois grupos de testes, o primeiro para verificar se a cultura isolada pertence ao Grupo *B. cereus* e o segundo para diferenciar *B. cereus* dos demais bacilos do Grupo.

Para confirmar a cultura no grupo *B. cereus*, a 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Bennett & Belay, 2001) recomenda o teste confirmatório rápido de Holbrook & Anderson (1980), uma técnica que combina a coloração de esporos de Ashby e a coloração de gordura intracelular de Burdon. No método de Holbrook & Anderson, o isolamento de *B. cereus* é feito em PEMBA (Polymyxin Pyruvate Egg-Yolk Bromothymol Blue Agar). Segundo os autores, apenas *B. cereus*, dentre as espécies de *Bacillus* capazes de crescer em PEMBA, apresentam glóbulos de lipídios intracelulares. Devido à similaridade na composição e características diferenciais, o PEMBA pode ser substituído pelo KG, no método descrito pelo *Compendium*.

Colônias com características típicas no MYP ou KG também podem ser confirmadas no Grupo *B. cereus* através de provas bioquímicas. As características mais típicas do grupo são determinadas, incluindo o teste de utilização anaeróbia da glucose, o teste de decomposição da tirosina, o teste de VP, o teste de nitrato e o teste de resistência à lisozima. Quando há necessidade ou interesse em uma identificação mais rigorosa, para fins regulatórios, por exemplo, o *Compendium* recomenda aplicar o teste de Holbrook & Anderson e as provas bioquímicas. Quando não há necessidade de uma identificação mais rigorosa e as colônias são típicas no KG ou no MYP, as provas bioquímicas podem substituir o teste de Holbrook & Anderson.

Para diferenciar *B. cereus* dos demais bacilos do Grupo, os testes aplicados são a verificação da produção de cristais de toxinas intracelulares, a verificação da motilidade, a verificação de crescimento rizóide e a verificação de atividade hemolítica.

11.2. MÉTODO DE CONTAGEM DIRETA EM PLACAS

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 32 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Bennett & Belay, 2001).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

11.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem presuntiva

- Placas de Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP) ou Ágar Kim-Goepfert (KG)
- Alças de espalhamento (Drigalski)
- Estufa incubadora regulada a 30-32ºC com termômetro calibrado

Confirmação do grupo *B. cereus* pelo teste de Holbrook & Anderson

- Solução de Verde Malaquita 5%
- Solução de Sudan Black (0,3% peso/volume em etanol 70%)
- Solução de Safranina 0,5% aquosa
- Xileno (PA)

Confirmação do grupo *B. cereus* por provas bioquímicas (opcional)

- Placas de MYP (se o isolamento foi feito em KG)
- Tubos de Ágar Nutriente (NA) inclinados
- Tubos de Caldo Vermelho de Fenol 1% Glucose
- Tubos de Ágar Tirosina
- Tubos de Caldo VP modificado para *Bacillus*
- Tubos de Caldo Nitrato
- Tubos de Ágar Nutriente 0,001% Lisozima
- Vaselina líquida ou óleo mineral estéril (ou sistema de geração de anaerobiose)
- Reagentes de Barrit para teste de VP (solução alcoólica 5% de alfa-naftol, solução aquosa de KOH 40%, creatina em cristais)
- Reagentes para Teste de Nitrato (solução 0,8% de ácido sulfanílico, solução 0,5% de alfa-naftol em ácido acético, pó de zinco livre de nitrato ou nitrito)
- Estufa incubadora regulada a 35°C com termômetro calibrado

Diferenciação dos membros do grupo *B. cereus*

- Tubos de NA inclinados
- Ágar Motilidade para *B. cereus*
- Placas de Ágar Nutriente (NA)
- Ágar Tripticase de Soja (TSA) suplementado com sangue de carneiro
- Solução de Azul Brilhante de Coomassie
- Estufa incubadora regulada a 30°C com termômetro calibrado

11.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise de *B. cereus* pelo método de plaqueamento direto encontra-se descrito na Figura 11.1.

a) Preparação da amostra, inoculação e incubação

Para a preparação da amostra e diluições seriadas, seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular 0,1ml de cada diluição em placas de Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP) ou Ágar Kim-Goepfert (KG), previamente preparadas e secadas (plaqueamento em superfície). Espalhar o inóculo com alças de Drigaslski, até que todo o líquido seja absorvido pelo meio de cultura. Recomenda-se que na contagem de *B. cereus* e outras bactérias esporogênicas, seja utilizada uma alça estéril diferente para cada diluição, porque a flambagem em álcool não elimina os esporos. Havendo suspeita de contagens inferiores a 100 UFC/g, inocular 1ml da primeira diluição da amostra, distribuindo o volume por quatro placas de MYP ou KG, três com 0,3ml e uma com 0,1ml. Havendo interesse em contar exclusivamente os esporos, submeter a amostra a choque térmico por 15 minutos a 70°C.

Aguardar que as placas sequem completamente e incubar invertidas, a 30-32°C/20-24h.

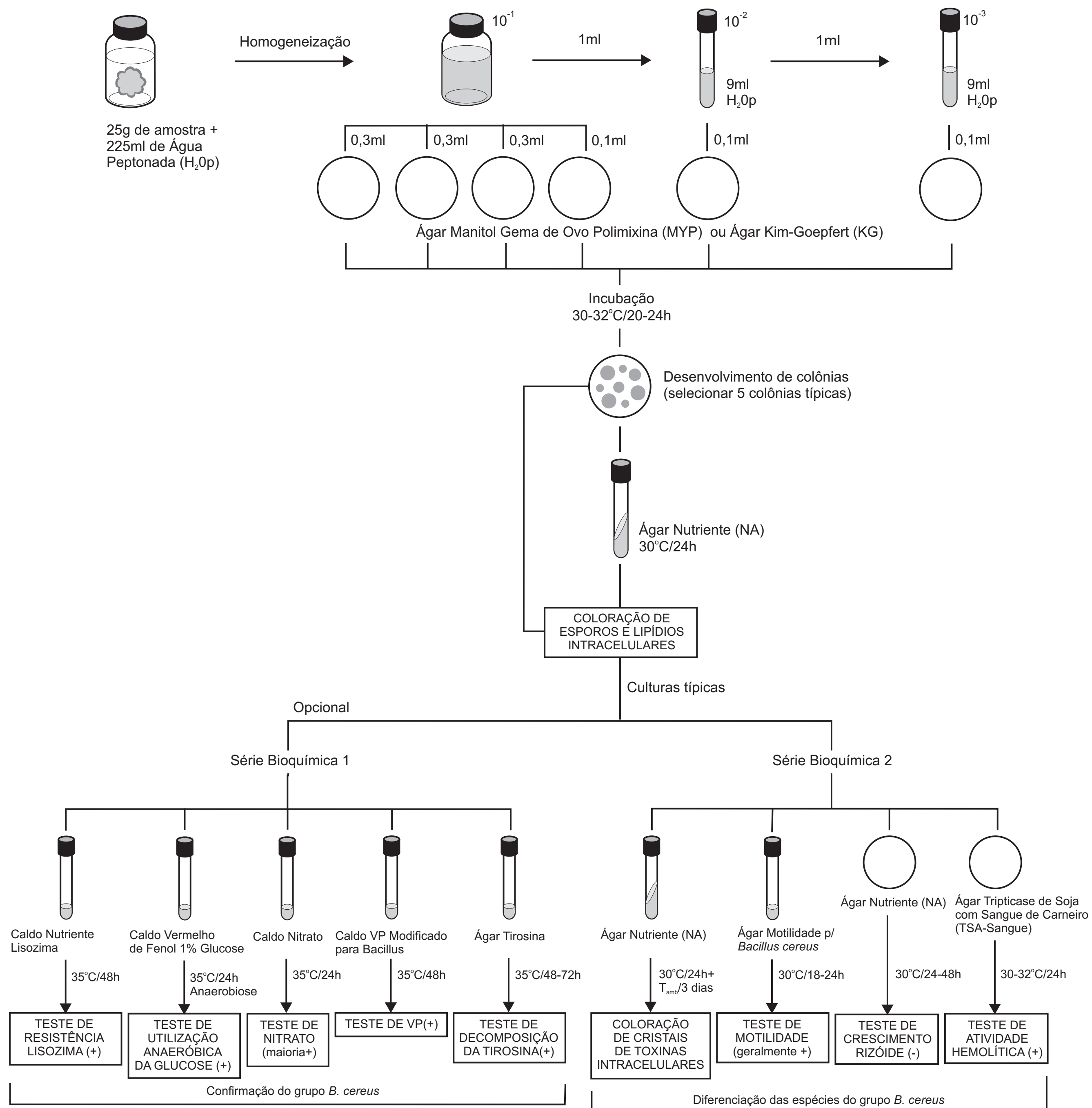


Figura 11.1. Esquema de análise para contagem de *B. cereus* por plaqueamento direto (Bennett & Belay, 2001).

b) Contagem das colônias presuntivas

Selecionar para a contagem placas com 10 a 100 colônias, contendo não mais do que 30 colônias típicas de *B. cereus,* pois estas colônias são grandes e os halos característicos podem confundir-se em placas muito cheias.

No KG as colônias típicas de *B. cereus* são esféricas, com bordas perfeitas, planas e secas, translúcidas ou levemente creme, rodeadas por um grande halo de precipitação, devido à reação com a gema de ovo. Menos freqüentemente, mas ainda consideradas típicas, as bordas são irregulares e, nesses casos, normalmente são brancas no centro e translúcidas em redor do centro.

No MYP são idênticas às do KG, mas apresentam ainda uma coloração rósea leitosa ao redor das colônias, típica da não-fermentação do manitol.

Cuidado: O MYP e o KG podem permitir o crescimento de *B. anthracis,* patogênico, com colônias indistinguíveis das colônias de *B. cereus*. Para prevenir riscos de contaminação do analista e do laboratório, recomenda-se: 1) que o manuseio das placas seja feito sobre bandejas e não diretamente sobre as bancadas, 2) que ao trabalhar em capela de fluxo laminar se utilize um modelo vertical, adequado ao manuseio de patógenos, 3) que se mantenha ao alcance das mãos um frasco de desinfetante como solução de cloro a 100ppm ou solução de álcool iodado, para descontaminar qualquer descarga inadvertida de material contaminado, 4) que o descarte seja precedido da descontaminação em autoclave a 121°C/30min, 5) que toda a área de trabalho seja prontamente descontaminada, uma vez concluídas as análises.

c) Confirmação das colônias no Grupo *B. cereus*

Selecionar pelo menos cinco colônias típicas bem isoladas para a confirmação. Se houver menos de cinco colônias, selecionar todas.

Aplicar o teste confirmatório rápido de Holbrook & Anderson (descrito no item c.1). Havendo necessidade ou interesse em uma verificação mais rigorosa das características típicas do grupo, aplicar também as provas bioquímicas (descritas nos itens c.2 a c.6). Se as colônias obtidas no KG ou MYP forem bem típicas, o teste confirmatório rápido de Holbrook & Anderson pode ser substituído pelas provas bioquímicas.

c.1) Teste confirmatório rápido de Holbrook & Anderson (coloração de esporos e glóbulos de lípidios intracelulares). As colônias obtidas no KG podem ser submetidas ao teste confirmatório rápido diretamente da placa de contagem. As colônias obtidas no MYP devem ser repicadas em tubos com Ágar Nutriente (NA) inclinado e incubadas a 30°C/24h, antes da realização do teste. Procedimento:

- ♦ Preparar um esfregaço da cultura, tomando o inóculo no centro da colônia, se a cultura estiver com 24h, ou na borda da colônia, se a cultura estiver com 48h. Deixar secar naturalmente e fixar na chama com o mínimo de calor.
- ♦ Cobrir o esfregaço com Solução Aquosa 5% de Verde Malaquita e corar a quente durante dois minutos. Para aquecer a solução de verde de malaquita, há três opções: 1) colocar a lâmina sobre um suporte vazado e o suporte sobre um banho ou frasco com água sob fervura, para aquecer com o vapor de água. 2) colocar sob a lâmina um "swab" com álcool em chamas, até observar a saída de vapor (sem ferver). 3) passar a lâmina cuidadosamente na chama de um bico de Bunsen, até a emissão de vapor (sem ferver), pelo menos duas vezes, com intervalo de um minuto.
- ♦ Após o tempo de contato de dois minutos, lavar a lâmina em água corrente, secar com lenço de papel (apenas encostar a lâmina no lenço de papel, sem esfregar) e cobrir com Solução de Sudan Black (0,3% peso/volume em etanol 70%) por 20min.
- ♦ Descartar o excesso de corante, secar com lenço de papel e lavar a lâmina com xileno (PA), por cinco a dez segundos. **Cuidado**. O xileno é inflamável e os vapores são irritantes e depressores do sistema nervoso central, podendo provocar dor de cabeça, tontura, náusea, perda de consciência e outros sintomas. Manusear com luvas, em capela de exaustão. Não descartar o excedente na pia, manter na capela de exaustão até evaporar.

Nota) O Manual da Oxoid (2000), na descrição do meio *Bacillus cereus* Selective Agar Base (CM 617), recomenda substituir o xileno por Citroclear (H.D. Supplies, 44 Rabans Close, Rabans Lane Industrial Estate, Aylesbury, Buckinghamshire, England, HP19 3RS).

- Secar imediatamente com com lenço de papel e cobrir com Solução de Safranina 0,5% por 20 segundos.
- Lavar em água corrente, secar com lenço de papel e observar ao microscópio óptico com objetiva de imersão. Os membros do grupo *B. cereus* vão apresentar a) glóbulos de lipídios corados de azul escuro, dentro do citoplasma das células, b) esporos centrais a subterminais, sem dilatação do esporângio, corados de verde pálido, c) células vegetativas, coradas de vermelho.

c.2) Teste de utilização anaeróbia da glucose (opcional). Inocular uma alçada da cultura em um tubo de Caldo Vermelho de Fenol 1% glicose, previamente desaerado (fervura por 15 minutos em banho, com as tampas afrouxadas, seguida do imediato resfriamento em banho de gelo). Cobrir a superfície do caldo com óleo mineral ou vaselina líquida estéril e incubar a 35°C/24h. Alternativamente, em lugar de cobrir o meio com óleo ou vaselina, pode-se incubar os tubos em atmosfera anaeróbia, obtida por um dos métodos relacionados no Capítulo específico de *Clostridium perfringens*. Observar se há ocorrência de viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio de vermelho para amarelo (teste positivo) ou se o meio permanece com a cor inalterada (teste negativo). As cepas de *B. cereus* utilizam a glucose anaerobicamente.

c.3) Teste de decomposição da tirosina (opcional). Estriar uma alçada da cultura na rampa de um tubo de Ágar Tirosina inclinado e incubar a 35°C/48-72h. Observar se há desenvolvimento de uma zona clara e transparente de decomposição e dissolução dos cristais de tirosina, na região abaixo da rampa (teste positivo), ou não formação dessa zona, mantendo o meio opaco inalterado (teste negativo). As cepas de *B. cereus* decompõem a tirosina rapidamente, formando uma zona de 3-4mm de profundidade em 48-72h. É também comum o escurecimento do meio ao longo da região de crescimento, com desenvolvimento de uma coloração castanha.

c.4) Teste de Voges-Proskauer (opcional). Inocular uma alçada com inóculo leve da cultura em um tubo de Caldo VP Modificado para *Bacillus* e incubar a 35°C/48h. Adicionar, para cada 1ml de cultura, 0,6ml de solução de α-naftol 5%, 0,2ml de solução de KOH 40% e uma pitada de cristais de creatina, na ordem indicada. Agitar vigorosamente, deixar descansar e observar periodicamente, por até uma hora, o desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura (teste positivo). A permanência do meio na cor amarelada dos reagentes indica teste negativo. As cepas de *B. cereus* são VP positivas.

c.5) Teste de redução do nitrato (opcional). Inocular uma alçada com inóculo pesado da cultura em um tubo com 3-4ml de Caldo Nitrato e incubar a 35°C/24h. Após a incubação, adicionar aos tubos 0,25ml de cada um dos reagentes para teste de nitrato (A = Solução 0,8% de ácido sulfanílico; B = Solução 0,5% de α-naftol). Observar o desenvolvimento de uma cor rósea avermelhada em no máximo dez minutos (teste positivo). Em caso negativo, adicionar uma pitada de pó de zinco, deixar em repouso por dez minutos e observar se o meio permanece com a cor inalterada (teste positivo) ou adquire uma coloração rósea avermelhada (teste negativo). A maioria das cepas de *B. cereus* reduz o nitrato, sendo poucas as cepas negativas para essa característica.

c.6) Teste de resistência à lisozima (opcional). Inocular uma alçada da cultura em um tubo de Caldo Nutriente suplementado com 0,001% de lisozima, inoculando também um tubo de Caldo Nutriente não suplementado (controle). Incubar a 35ºC/48h e observar se ocorre crescimento nos dois tubos (teste positivo) ou apenas no tubo controle (teste negativo). As cepas de *B. cereus* são resistentes à lisozima.

d) Diferenciação das espécies do Grupo *B. cereus*

Esses testes aplicam-se às culturas confirmadas como pertencentes ao Grupo *B. cereus*, para diferenciação das espécies dentro do Grupo.

d.1) Coloração de cristais de toxinas intracelulares (Método de Sharif & Alaeddinoglu, 1988). Inocular uma alçada da cultura na rampa de um tubo de Ágar Nutriente (NA) inclinado e incubar a 30ºC/24h. Manter o tubo à temperatura ambiente por três dias, para envelhecer a cultura, permitir a formação de esporos e a lise dos esporângios. Preparar um esfregaço da cultura, fixando levemente pelo calor. Cobrir o esfregaço por três minutos com uma Solução de Azul Brilhante de Coomassie (0,25g de azul brilhante de coomassie + 50ml de etanol absoluto + 7ml de ácido acético glacial + 43ml de água destilada). Lavar a lâmina em água corrente, aguardar secar e observar em microscópio óptico, sob imersão. As cepas de *B. thuringiensis* vão apresentar esporos livres não corados, células vegetativas (bastonetes) coradas de azul e cristais livres corados de azul intenso, tetragonais e bem menores do que as células vegetativas. No interior das células vegetativas (coradas de azul) os esporos e os cristais aparecem brancos. As cepas de *B. cereus* não produzem cristais.

Nota d.1) O procedimento descrito no *Compendium* é diferente, bem mais trabalhoso e utiliza metanol, tóxico, que deve ser manuseado com cuidado, evitando-se inalação ou contato com a pele (trabalhar com luvas e máscara protetora): Cultivar a cultura da mesma forma descrita acima e preparar o esfregaço. Cobrir o esfregaço com metanol por 30 segundos, descartar o excesso de álcool e flambar, para fixação definitiva. Cobrir em seguida o esfregaço com uma solução aquosa 0,5% de fucsina básica, aquecer delicadamente à chama, até a emissão de vapores, aguardar dois minutos e aquecer novamente até nova emissão de vapores. Aguardar 30 segundos, lavar a lâmina em água corrente, secar e observar ao microscópio óptico, sob imersão. As cepas de *B. thuringiensis* vão apresentar esporos livres e uma grande quantidade de cristais tetragonais corados de vermelho.

d.2) Teste de motilidade. Inocular a cultura em um tubo de Ágar Motilidade para *B. cereus*, por picada, no centro do meio e até a profundidade de 1cm do fundo do tubo. Incubar a 30ºC/18-24h e observar se ocorreu migração das células para as regiões fora da linha de inoculação (motilidade positiva) ou se o crescimento restringiu-se à linha da picada (motilidade negativa). Opcionalmente, a característica de motilidade pode ser observada ao microscópio. Adicionar 0,2ml de água destilada estéril à rampa de um tubo de NA inclinado e estriar uma alçada da cultura na rampa umidificada. Incubar a 30ºC/6-8h e transferir uma alçada da cultura, coletada do líquido na base da rampa, para uma gota de água destilada estéril depositada numa lâmina de vidro. Emulsionar o material, cobrir com uma lamínula e observar ao microscópio. As cepas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* geralmente são ativamente móveis, enquanto as cepas de *B. anthracis* e *B. mycoides* são imóveis.

d.3) Verificação de crescimento rizóide. Depositar uma alçada da cultura no centro de uma placa de Ágar Nutriente (NA), sem espalhar. Incubar a 30°C/24-48h e observar se a colônia desenvolvida apresenta crescimento rizóide (a massa de células se estende para fora do ponto de inoculação, como raízes), característico das cepas de *B. mycoides*.

d.4) Verificação de atividade hemolítica. Inocular até seis culturas em uma placa de Ágar Tripticase de Soja suplementado com sangue de carneiro (TSA-Sangue), transferindo o inóculo para um único ponto do meio, por simples contato. Incubar a 30-32°C/24h e observar se há formação de um halo claro de hemólise em redor das colônias (teste positivo). As cepas de *B. cereus* são fortemente hemolíticas, produzindo halos grandes e bem nítidos, enquanto *B. mycoides* e *B. thuringiensis* são fracamente hemolíticos, produzindo halos menores ou, eventualmente, zona de hemólise restrita à região sob a colônia. As cepas de *B. anthracis* geralmente não são hemolíticas.

e) Cálculo dos resultados

Calcular o número de UFC/g ou ml em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

Exemplo: Diluição 10^{-1}, plaqueamento em superfície, seis colônias típicas, seis submetidas à confirmação, três confirmadas (50%). UFC/g ou ml = $6x10^{1}x10x0,5 = 3,0x10^{2}$.

11.3. MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 32 da 4° Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Bennett & Belay, 2001).

O método do NMP é uma alternativa que pode ser utilizada quando as contagens esperadas encontram-se abaixo do limite de detecção do plaqueamento, que é de 100 UFC/g. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

11.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem presuntiva

- Tubos de Caldo Tripticase de Soja (TSB) suplementado com polimixina
- Estufa incubadora regulada a 30°C com termômetro calibrado

Confirmação

- Os mesmos itens requeridos na contagem em placas

11.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise de *B. cereus* pelo método do NMP encontra-se descrito na Figura 11.2 Para a preparação da amostra e diluições seriadas, seguir as orientações do Capítulo 2.

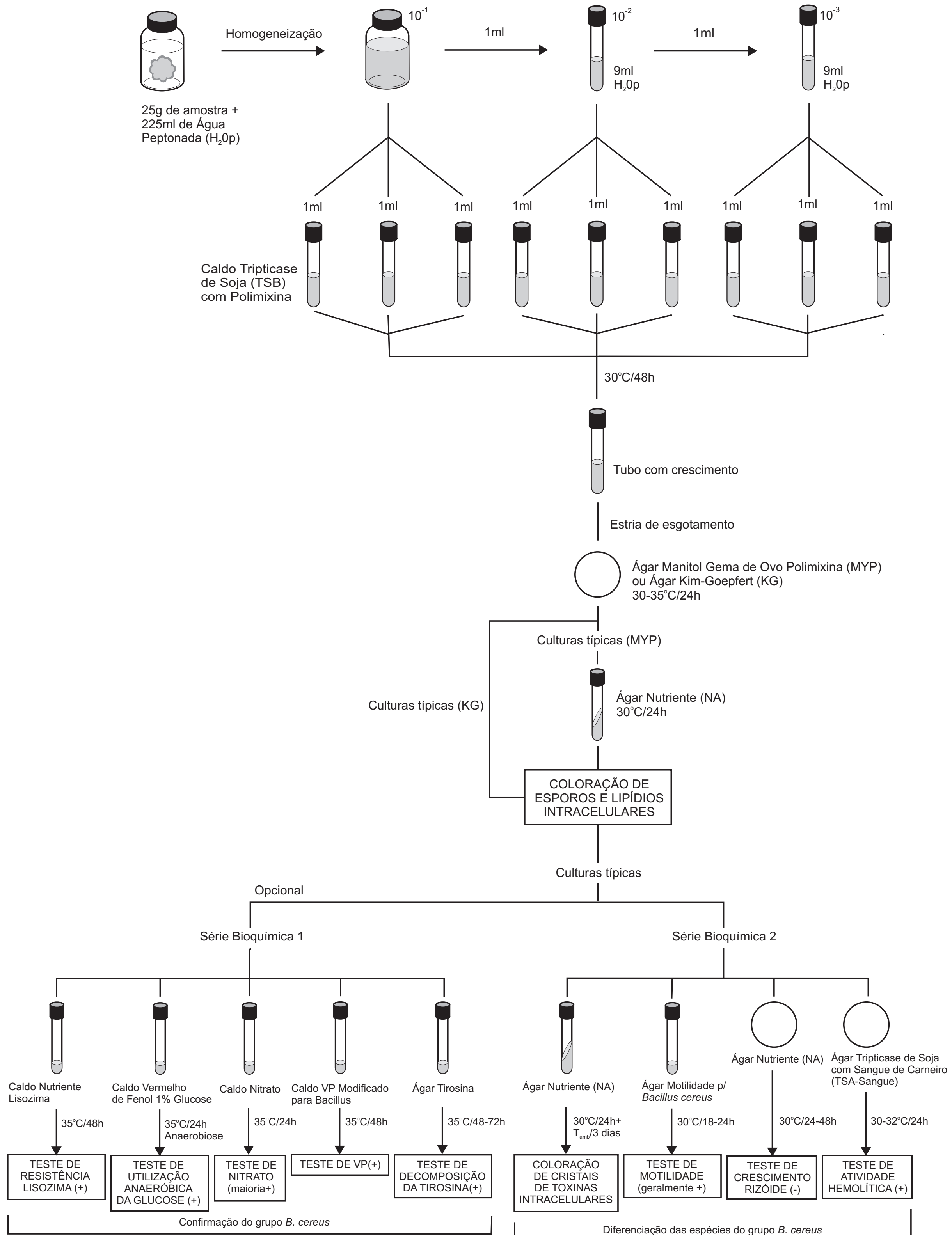


Figura 11.2. Esquema de análise para contagem de *B. cereus* pelo método do NMP (Bennett & Belay, 2001).

Inocular três alíquotas de 1ml das três primeiras diluições da amostra em uma série de três tubos de Caldo Tripticase de Soja (TSB) suplementado com polimixina B, na mesma concentração utilizada no Ágar Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP). Incubar os tubos a 30ºC/48h.

Observar crescimento denso, típico de *B. cereus* e estriar uma alçada de cada tubo com crescimento em placas de MYP ou Ágar Kim-Goepfert (KG), incubando as placas a 30-32ºC/20-24h. Verificar a formação de colônias típicas de *B. cereus,* descritas no item 11.2 e selecionar uma ou mais colônias de cada placa para confirmação, que deve ser feita seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 11.2.

Anotar o número de tubos cujas culturas foram confirmadas e determinar o Número Mais Provável (NMP)/g conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

11.4. REFERÊNCIAS

BENNETT, R.W. & BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D. C, 2001. Chapter 32, p.311-316.

DEAN, D.H., 1984. Biochemical genetics of the bacterial insect-control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** 2:341-363.

Di FRANCO, C., BECCARI, E., SANTINI, T. *et al.*, 2002. Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. **BMC Microbiology 2 (1)**: 33-48.

EUZÉBY, J.P., 2003. **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**. http://www.bacdico.net (acesso em 16/01/06).

FDA (Food and Drug Administration), 2001. **Bacteriological Analytical Manual Online**, Capítulo 14. Disponível no site: http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html (acesso em 16/01/06).

HOLBROOK, R. & ANDERSON, J.M., 1980. An improved selective diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Canadian Journal of Microbiology 26**:753-759.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. **Microrganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food pathogens**. Blackie Academic & Professional, London (ISBN 0 412 47350 X).

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. **Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN0-306-47262-7).

LECHNER, S., MAYR, R, FRANCIS, K.P. *et al.*, 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology 48**:1373-1382.

NAKAMURA, L.K., 1998. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology** 48:1031-1035.

SHARIF, F.A. & ALAEDDINOGLU, N.G., 1988. A rapid and simple method for staining of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Industrial Microbiology 3:**227-229.

SOUZA, M.T., LIMA, M.I., SILVA-WERNECK, J.O. et al, 1999. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell 23**:43-49.

VALADARES-INGLIS, M.C., SOUZA, M.T., SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 1, p. 208-217.

Capítulo 12

Clostrídios Sulfito Redutores
Clostridium perfringens

12.1. INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é uma bactéria patogênica cujas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são classificadas pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) em dois grupos de risco. A DTA provocada pelas cepas do tipo A, muito comum, é classificada no grupo de risco III, que inclui as doenças "de perigo moderado, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou seqüelas, com sintomas auto limitados mas que provocam severo desconforto". A DTA provocada pelas cepas do tipo C (enterite necrótica), muito mais rara, é classificada no grupo de risco IB, que inclui as doenças "de severo perigo para população restrita, representando ameaça de morte, seqüelas crônicas ou longa duração".

Principais características de *C. perfringens*

A maioria das informações abaixo são dos livros *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook* "*Bad Bug Book*" (FDA/CFSAN, 2005), *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance* (Bates, 1997), *Microorganisms in Foods 5 – Microbiological Specifications of Food Pathogens* (ICMSF, 1996) e *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II* (Cato *et al.*, 1986).

As cepas de *C. perfringens* são Gram-positivas na forma de bastonetes, anaeróbias estritas e imóveis. São esporogênicas e esporulam facilmente no intestino, mas raramente em meios de cultura. Cerca de três quartos das cepas também formam cápsulas, predominantemente compostas de polissacarídeos. São sulfito redutoras, fermentam a lactose, reduzem o nitrato e hidrolisam a gelatina. O pH ótimo de crescimento é 7,2, com mínimo entre 5,5 e 5,8 e máximo entre 8,8 e 9,0. A atividade de água mínima é de 0,93. O crescimento é estimulado pela presença de um carboidrato fermentável e não é inibido por 20% de bile.

Uma das características mais marcantes de *C. perfringens* é a de crescer ativamente em altas temperaturas, com máxima de 50°C, ótimo na faixa de 43 a 47°C e tempo de geração de apenas 10min a 45°C. A 45-46°C também fermenta o leite rapidamente, produzindo um tipo de coagulação típica, chamada de coagulação tempestuosa. Essa reação, caracterizada pelo rompimento e deslocamento do coágulo (devido á formação de gás) pode ser provocada em cinco horas ou menos, a partir de um inóculo pesado de culturas jovens e ativas (Rhodehamel & Harmon, 2001).

Em baixas temperaturas, ao contrário, as células vegetativas de *C. perfringens* são muito sensíveis, com temperatura mínima de crescimento relatada entre 12 e 15ºC. Morrem rapidamente entre zero e 10°C e a estocagem por poucos dias sob refrigeração ou congelamento pode levar a uma redução de três a cinco ciclos logarítmicos na contagem em placas. São também relativamente sensíveis ao NaCl, crescendo bem em concentrações de até 2% mas não em 6,5%.

C. perfringens é capaz de produzir uma série de toxinas, embora cada cepa, individualmente, produza apenas um número limitado das inúmeras conhecidas. Com base na capacidade de produzir as quatro toxinas mais letais (alfa, beta, epsilon e iota), as cepas da espécie são classificadas em cinco tipos: A, B, C, D e E, conforme mostrado na Tabela 12.1.

A toxina alfa é comum a todos os tipos, embora seja produzida em maior quantidade pelo tipo A. É uma fosfolipase que hidroliza a lecitina (lecitinase), não associada com doenças transmitidas por alimentos. Provoca gangrena gasosa (mionecrose), uma infecção de feridas que atinge animais e humanos. A produção da toxina alfa pode ser observada em meios contendo gema de ovo, nos quais as colônias apresentam um halo turvo de precipitação, característico da atividade de lecitinase. A inibição da atividade da toxina alfa pela respectiva antitoxina, nos mesmos meios de cultura (reação de Nagler), é um teste diagnóstico usado na confirmação de *C. perfringens*. Há, entretanto, cepas enterotoxigênicas que são lecitinase negativas e cepas que são fracamente positivas, não sendo detectadas nesse teste.

Tabela 12.1. Classificação de *C. perfringens* em tipos com base na produção das toxinas alfa, beta, epsilon e iota (Cato *et al.*, 1986).

Tipo de *C. perfringens*	Toxinas
Tipo A	alfa
Tipo B	alfa, beta, epsilon
Tipo C	alfa, beta
Tipo D	alfa, epsilon
Tipo E	alfa, iota

***C. perfingens* tipo A**. Nem todos os tipos de *C. perfringens* são associados com doenças transmitidas por alimentos, na maioria dos casos provocadas pelas cepas do tipo A. A doença é resultante da ação de uma enterotoxina chamada CPE (*C. perfringens* enterotoxin), produzida no intestino do hospedeiro após a ingestão de um número alto de células. A produção da CPE é associada com a formação de esporos "in vivo", estimulada pelas condições ácidas do estômago e pelos sais biliares no intestino. Durante o processo de esporulação, as células produzem CPE, liberada no organismo junto com os esporos, quando ocorre a lise do esporângio. A CPE provoca uma desordem intestinal caracterizada por cólica abdominal, diarréia e náusea, geralmente sem vômitos ou febre. O período de incubação é de seis a 24 horas, mais freqüentemente de 10-12 horas, durando em torno de 24 horas (em idosos ou enfermos pode durar até duas semanas).

Em surtos, o diagnóstico é confirmado pela detecção de *C. perfringens* nos alimentos suspeitos (contagem $\geq 10^5$/g) ou nas fezes dos pacientes (contagem $\geq 10^6$/g). A detecção da CPE em fezes de pacientes também confirma o diagnóstico. É importante ressaltar, entretanto, que pode não ser detectado um número alto de células nos alimentos, lembrando que *C. perfringens* perde a viabilidade se o produto for resfriados ou congelado por período de tempo prolongado. Nesses casos, a preparação de esfregaços do alimento e coloração de Gram podem auxiliar na verificação, sendo encontrado alto número de bastonetes grandes, típicos.

C. perfringens é amplamente distribuído no solo, poeira e vegetação. Também faz parte da microbiota normal do trato intestinal do homem e dos animais. Em humanos adultos saudáveis, a contagem em fezes é de cerca de 10^3-10^4/g de peso seco. Quando há envolvimento clínico as

contagens são muito mais elevadas, porém, é importante destacar que, em idosos saudáveis, é comum encontrar contagens elevadas de esporos.

A partir dessas fontes, *C. perfringens* pode atingir uma gama bastante variada de alimentos, sendo comum a presença de esporos em carcaças de bovinos e aves, em peixes, em vegetais, em condimentos, em massas, em farinhas, em gelatina, em leite e em pós para preparo de alimentos doces ou salgados.

Produtos cozidos ou assados (principalmente carnes), preparados em grandes quantidades e mantidos de um dia para o outro até o momento de servir, são os mais freqüentemente associados a surtos. Os esporos sobrevivem às temperaturas normais de cozimento e, durante o resfriamento lento (normal na refrigeração de grandes porções de alimentos) ou armazenamento em temperatura ambiente, podem germinar e se multiplicar. Embora seja uma bactéria anaeróbia, a sensibilidade de *C. perfringens* ao oxigênio é menos acentuada do que a de outros clostrídios, podendo crescer no interior da massa de alimentos. Mesmo que as refeições sejam reaquecidas para o consumo, o aquecimento inadequado permite a sobrevivência de um número suficiente de células para provocar a infecção. Alimentos como carne enrolada, panquecas, tortas ou bolos de carne também apresentam, em seu interior, condições favoráveis ao crescimento de *C. perfringens*, se mantidos em temperaturas abusivas. Da mesma forma, a prática de manter carne assada (churrasco) quente em caixas de isopor, até o momento de servir, oferece condições para a multiplicação de *C. perfringens*. Dependendo do tempo de permanência do produto nas caixas, a população pode atingir a dose infectiva e provocar a doença.

***C. perfringens* tipo C**. A ingestão alimentos contaminados com alto número de células de *C. perfringens* tipo C provoca enterite necrótica, uma doença muito mais séria, embora bem mais rara. É uma infecção grave, provocada pela toxina beta, que resulta em necrose do intestino, septicemia e, freqüentemente, morte. Segundo Bates (1997), os primeiros casos ocorreram durante a Segunda Guerra Mundial, devidos ao consumo de carne enlatada. Em 1966-1967, novos casos foram relatados na Nova Guiné, devidos ao consumo de carne de porco contaminada, sendo chamada de síndrome "pigbel". A toxina beta é sensível à tripsina, mas, na Nova Guiné, a população é mais vulnerável, devido ao alto consumo de batata doce. A batata doce contém um inibidor de tripsina que predispõe ao desenvolvimento da doença, particularmente em crianças e adolescentes. A fome e a desnutrição também reduzem o nível de tripsina no trato gastrointestinal, aumentando à susceptibilidade à toxina beta. Esse, provavelmente, foi um dos fatores associados aos casos de enterite necrótica durante a Segunda Guerra. Casos esporádicos têm sido relatados na Uganda, Malásia e Indonésia (Murrel, 1983).

Clostrídios sulfito redutores a 46°C

Clostrídios sulfito redutores, como diz o nome, são os clostrídios que reduzem o sulfito a sulfeto de hidrogênio (H_2S) a 46°C. Sua aplicação na análise de alimentos é oferecer uma indicação simples e rápida da potencial presença de *C. perfringens*, que também é sulfito redutor. Como *C. perfringens* cresce bem a 46°C, essa temperatura é utilizada para dar uma indicação mais precisa de *C. perfringens*, reduzindo o número de espécies que podem crescer. Ainda assim, um número significativo de espécies sulfito redutoras crescem a 46°C, incluindo *C. botulinum* e *C. sporogenes*.

Sartory *et al.* (2006) avaliaram 31 espécies de *Clostridium* no Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC), meio usado para a contagem de *C. perfringens* (a 35-37ºC) e clostrídios sulfito redutores (a 46ºC). Os resultados, sumariados na Tabela 12.2, mostraram que, além de *C. perfringens*, 16 das 31 espécies cresceram e reduziram o sulfito a 44ºC. Apenas duas espécies tiveram a capacidade de

redução do sulfito inibida pela elevação da temperatura (*C. ghonii* e *C. sphenoides*), crescendo nas duas temperaturas mas produzindo H_2S apenas a 37ºC.

Tabela 12.2. Espécies de clostrídios sulfito redutores detectadas no Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC) incubado a 37 e a 44ºC (Sartory *et al.*, 2006).

Espécie de *Clostridium*	Redução do sulfito em TSC a 37ºC	Redução do sulfito em TSC a 44ºC
C. perfringens	+	+
C. absonum	+	+
C. baratii	+	+
C. bifermentans	+	+
C. botulinum	+	+
C. butyricum	+/-[a]	+/-[a]
C. chauvoei	+/-[a]	+/-[a]
C. cochlearium	+	+
C. ghonii	+	-
C. histolyticum	+/-[a]	+/-[a]
C. limosum	+	+
C. paraputrificum	+	+
C. sardiniense	+	+
C. septicum	+	+
C. sordellii	+/-[a]	+/-[a]
C. sphenoides	+	-
C. sporogenes	+	+
C. tertium	+	+
C. tetanomorphum	+/-[a]	+/-[a]

[a] Resultado variável entre as cepas testadas.

C. perfringens em água

A contagem de esporos de *C. perfringens* em água tem sido utilizada para indicação de contaminação fecal, pois sua incidência no meio aquático está constantemente associada a dejetos humanos, sendo sua presença comum em fezes, esgotos e águas poluídas. Os esporos apresentam excepcional longevidade em água, em função da grande resistência aos desinfetantes e outras condições desfavoráveis do meio ambiente. Por esse motivo, são úteis na detecção de contaminação fecal remota, em situações nas quais outros indicadores, como *E. coli*, já não se encontrariam presentes. Sua detecção é recomendada como complemento aos outros testes bacteriológicos de avaliação da qualidade da água. Em esgotos e águas poluídas a população de esporos de *C. perfringens* geralmente excede a de vírus entéricos e bactérias patogênicas, logo, sua ausência em água destinada ao consumo humano também pode ser considerada uma indicação segura da ausência desses outros contaminantes.

Métodos de análise de *C. perfringens* em alimentos

Há vários meios de cultura disponíveis para a enumeração de *C. perfringens* em alimentos, como o Ágar Sangue Neomicina, o Ágar Sangue Cicloserina, o Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina

(SPS), o Ágar Triptona Sulfito Neomicina (TSN), Ágar Shahidi Ferguson Perfringens (SFP), o Ágar Tripticase de Soja Sangue de Carneiro (TSB), o Ágar Oleandomicina Polimixina Sulafadiazin Perfringens (OPSP) e o Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC), que pode ser utilizado com ou sem gema de ovo (Labbe, 2001).

A seletividade destes meios é resultante da incorporação de um ou mais antibióticos, para inibir diversos anaeróbios e anaeróbios facultativos e, salvo no caso dos meios com sangue, a característica diferencial comum a todos os demais é a presença de ferro e sulfito. Os clostrídios reduzem sulfito a sulfeto, que reage com o ferro e precipita na forma de sulfeto de ferro, produzindo colônias pretas. Dentre esses meios, o SPS e o TSN são considerados excessivamente seletivos e pouco satisfatórios, pois podem inibir diversas cepas de *C. perfringens*. No SPS algumas cepas podem crescer mas não produzir colônias características, pretas. O SFP, o OPSP e o Ágar Sangue Neomicina, ao contrário, são considerados pouco seletivos e, portanto, mais adequados para situações em que *C. perfringens* constitui-se na microbiota predominante no alimento. O Ágar Sangue Cicloserina parece adequado para a enumeração de *C. perfringens,* porém, os dados disponíveis para uma melhor avaliação do seu desempenho são limitados, uma vez que não tem sido utilizado rotineiramente na análise de alimentos (Labbe, 2001).

O Ágar TSC é o mais utilizado para a enumeração de *C. perfringens* por plaqueamento direto, constituindo-se também numa excelente alternativa para a enumeração de clostrídios sulfito-redutores em geral, conseguindo suprimir o crescimento de praticamente todos os anaeróbios facultativos que acompanham os clostrídios em alimentos. É importante ressaltar, entretanto, que o Ágar TSC (bem como os meios utilizados nas etapas subseqüentes da análise) permite o crescimento e produção de toxina de *C. botulinum,* devendo ser observados cuidados durante a execução dos testes, para garantir a segurança do analista e do laboratório.

Na enumeração de *C. perfringens,* o TSC pode ser suplementado com gema de ovo, para verificar a produção da toxina alfa (lecitinase). A incorporação da gema de ovo, entretanto, não apresenta muita vantagem, porque alguns anaeróbios facultativos podem produzir reação similar. Além disso, nem todas as cepas de *C. perfringens* produzem halo de reação de lecitinase, não sendo possível descartar as colônias sem halo. O halo produzido por uma colônia também pode ser obscurecido pelos halos de outras colônias, dificultando a visualização da reação.

As colônias presuntivas de *C. perfringens* em Ágar TSC devem ser confirmadas por testes bioquímicos, sendo mais recomendadas as características motilidade, fermentação da lactose, hidrólise da gelatina e redução do nitrato a nitrito.

Métodos de análise de clostrídios sulfito redutores a 46°C em alimentos

Para a quantificação de clostrídios sulfito redutores em alimentos é utilizada a técnica de contagem direta em placas. São recomendados os mesmos meios de cultura aplicados à contagem de *C. perfringens*, incubados a 46°C/24h sob anaerobiose. A confirmação resume-se à coloração de Gram, considerando-se confirmadas as culturas Gram positivas na forma de bastonetes (ANVISA, 2001).

Método de análise de esporos de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* em água

Ao contrário dos alimentos, na análise de água o mais comum é a enumeração dos esporos de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens.* O procedimento mais simples para a contagem de esporos de clostrídios sulfito redutores é o método ISO 6461-1:1986. É uma técnica de tubos

múltiplos para a determinação do número mais provável (NMP), proposto por Gibbs & Freame (1965) e utilizado por Freame & Fitzpatrick (1971), para a contagem de clostrídios em alimentos. Para a contagem dos esporos em água, a inoculação é feita no Caldo DRCM (Differential Reinforced Clostridium Medium), meio de enriquecimento diferencial para clostrídios sulfito redutores. As características diferenciais são conferidas pela presença de sulfito de sódio e citrato férrico. A redução do sulfito resulta em sulfeto, que reage com o ferro formando sulfeto de ferro, preto, com escurecimento do meio.

Para a confirmação de *C. perfringens* pode ser usado o procedimento da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 1993), que adotou o método ISO 6461-1:1986 como presuntivo e faz a confirmação no Leite Tornassolado (Litmus Milk). Nesse meio pode ser evidenciada a fermentação tempestuosa do leite, característica típica de *C. perfringens.* A fermentação do leite resulta na formação de coágulo e na produção de grande quantidade de gás, que rompe e desloca o coágulo formado. A produção de ácido durante a fermentação também pode ser observada, através da viragem do azul de tornassol presente, mudando a cor do meio para cor de rosa.

Para amostras em que se espera ausência ou baixas contagens (menor do que 10/ml), como é o caso das águas minerais e naturais, engarrafadas ou não, destinadas ao consumo humano, recomenda-se distribuir 10 porções de 10ml da amostra em 10 tubos contendo 10ml do caldo de cultura, em concentração dupla, totalizando 100ml de amostra, como é requerido pela legislação brasileira (ANVISA, 2005). Para amostras em que a concentração dos microrganismos seja maior, recomenda-se trabalhar com diluições, inoculando-se uma série de 5 tubos para cada diluição. O teste presuntivo é feito com a amostra previamente submetida a choque térmico, para eliminação de células vegetativas.

12.2. MÉTODO DE PLAQUEAMENTO DIRETO *C. perfringens* em alimentos

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 34 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Labbe, 2001).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

12.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Solução Glicerol Sal Tamponada (para estocagem congelada de amostras)
- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml
- Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem presuntiva

- Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC)
- Sistema de geração de anaerobiose (Anaerobac da Probac do Brasil, Anaerogen da Oxoid, Anaerocult A da Merck, ou GasPak® da BD Biosciences).
- Estufa incubadora regulada a 35-37°C com termômetro calibrado

Testes confirmativos

- Tubos de Meio de Tioglicolato (TGM)
- Tubos de Meio de Leite Ferro (opcional)
- Tubos de Meio de Lactose Gelatina
- Tubos de Ágar Nitrato Motilidade
- Reagentes para Teste de Nitrato (Solução 0,8% de ácido sulfanílico, Solução 0,5% de alfa-naftol, Zinco em pó livre de nitrato ou nitrito)
- Tubos de Meio de Fermentação para *C. perfringens*
- Solução 0,04% de Azul de Bromotimol

12.2.2. PROCEDIMENTO

O procedimento para contagem de *C. perfringens* em alimentos pelo método do plaqueamento direto encontra-se descrito na Figura 12.1.

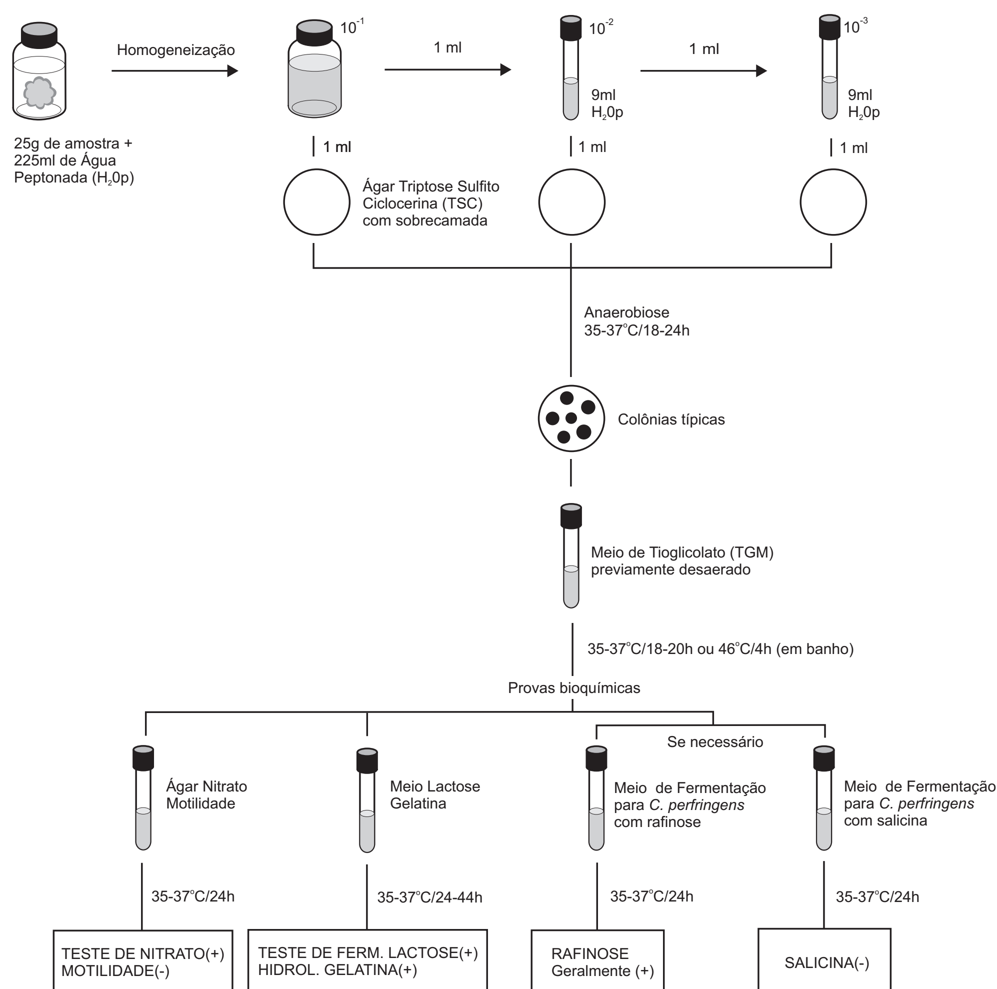


Figura 12.1. Esquema de análise para contagem de *C. perfringens* em alimentos por plaqueamento direto (Labbe, 2001).

a) Estocagem das amostras para a análise

O *Compendium* recomenda que amostras destinadas à enumeração de *C. perfringens* sejam analisadas, se possível, imediatamente. Na impossibilidade de se proceder à análise imediata, que sejam refrigeradas pelo menor tempo possível, não devendo ser congeladas ou mantidas sob refrigeração prolongada. Havendo necessidade de estocagem por mais de 48 horas, tratar as amostras com Solução Glicerol Sal Tamponada (na quantidade requerida para atingir a concentração final de 10% na amostra) e estocar entre 55 e 60°C negativos.

O *Bacteriological Analytical Manual* (Rhodehamel & Harmon, 2001) recomenda que sejam analisadas imediatamente ou refrigeradas por não mais de oito horas, à temperatura próxima de 10°C. Para transporte e estocagem por período superior a oito horas, preparar assepticamente a amostra para o congelamento, da seguinte forma: transferir porções de 25g para bolsas plásticas, adicionar 25ml da Solução Glicerol Sal Tamponada, excluir o ar das bolsas e misturar. Para amostras líquidas, misturar porções de 25ml com igual volume da Solução Glicerol Sal Tamponada, em concentração dupla. Congelar imediatamente em "freezer", a 20-30ºC negativos. Para o transporte, transferir as amostras tratadas para frascos não permeáveis ao CO_2 (Nalgene ou equivalente) e transportar em caixa de isopor com gelo seco. Manter as amostras congeladas até o momento da análise, de preferência por poucos dias. Para a preparação da primeira diluição, adicionar 200ml de Água Peptonada Tamponada às porções previamente descongeladas.

b) Preparação das amostras e inoculação

Para a preparação da amostra e diluições decimais seriadas, seguir as recomendações do Capítulo 2. As amostras não devem ser submetidas a choque térmico, para contagem de esporos (uma prática comum na análise de fezes), porque *C. perfringens* raramente esporula em alimentos. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular em Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC), plaqueamento em superfície ou em profundidade. Alternativamente, pode-se utilizar o Ágar TSC com gema de ovo, plaqueamento em superfície. Aguardar que as placas sequem e cobrir a superfície com uma sobrecamada de TSC, sem gema de ovo.

c) Incubação

Aguardar a completa solidificação da sobrecamada e incubar as placas a 35-37ºC/18-24h, em atmosfera anaeróbia, sem inverter.

Para obtenção da atmosfera anaeróbia, pode-se utilizar o processo de exaustão de ar e introdução de 90% de gás nitrogênio e 10% de gás carbônico, em incubadora anaeróbia ou jarro tipo Baird & Taitlock. Através das válvula de admissão e de exaustão, proceder à exaustão e introdução dos gases por três ou quatro vezes.

Alternativamente, pode-se utilizar sistemas geradores de anaerobiose, disponíveis comercialmente (BD Biosciences GasPak® Anaerobic Systems, Anaerogen Oxoid, Anaerocult A Merck, Anaerobac Probac do Brasil).

d) Contagem das colônias presuntivas de *C. perfringens*

Selecionar placas com 20 a 200 colônias e contar as colônias típicas de *C. perfringens*: pretas e, no caso do TSC com gema de ovo, podendo apresentar ou não um halo de precipitação, devido à reação de lecitinase com a gema de ovo.

Cuidado. O Ágar TSC permite crescimento e produção de toxina de *C. botulinum*, não havendo distinção entre suas colônias e as colônias de *C. perfringens* (Serrano & Junqueira, 1991). O manuseio e o descarte dessas placas, bem como de todo o material envolvido nas etapas subse-

qüentes da análise, devem ser feitos com o máximo cuidado, para evitar riscos de contaminação do analista e do laboratório. Trabalhar com luvas, colocar o material sobre bandejas, não diretamente sobre a bancada, nunca pipetar culturas com a boca, desinfetar todas as superfícies com solução de NaOH 1N e esterilizar todo o material de descarte a 121ºC/30min.

e) Confirmação das colônias típicas de *C. perfringens*

Selecionar cinco colônias típicas (10 no caso de análises oficiais) e transferir para Meio de Tioglicolato (TGM). Incubar a 46ºC/4h (em banho) ou a 35-37ºC/18-20h. Inocular a cultura obtida nos meios abaixo, para realização das provas bioquímicas de confirmação.

Colônias não isoladas devem ser purificadas por estrias em Ágar TSC (a partir do TGM) e novamente inoculadas no TGM, antes da realização das provas bioquímicas.

> **Nota e.1)** Um teste não incluído no procedimento descrito pelo *Compendium* é o teste de coagulação tempestuosa no Meio de Leite Ferro, recomendado pela FDA (Food and Drug Administration) e descrito no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) Online (Rhodehamel & Harmon, 2001). Para a investigação de surtos, o BAM recomenda que seja feita toda a bateria de testes de confirmação. Para outras finalidades, o teste de fermentação tempestuosa pode ser suficiente, considerando confirmadas as culturas que exibirem resultado positivo em cinco horas ou menos (quanto mais rápida a fermentação, maior a evidência de que seja *C. perfringens*). Algumas cepas podem exigir seis horas para a fermentação e esses casos devem ser submetidos aos demais testes. Culturas negativas em seis horas ou mais são consideradas não confirmadas como *C. perfringens.* Procedimento: A partir da cultura jovem (18-20h) em TGM, inocular 1ml em tubos de Meio de Leite Ferro e incubar a 46ºC/2h. Após duas horas de incubação, observar a cada hora, por até seis horas, se ocorre coagulação tempestuosa do leite, com rompimento e deslocamento do coágulo para cima (teste positivo) ou a ocorrência de coagulação normal ou não coagulação do leite (teste negativo).

e.1) Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina (meio de lactose gelatina). Inocular uma alçada com inóculo pesado da cultura em tubos de Meio de Lactose Gelatina (previamente desaerados) e incubar a 35-37ºC/24-44h. Observar se há formação de bolhas e viragem ácida do indicador (vermelho de fenol), alterando a cor do meio de vermelha para amarela (fermentação da lactose positiva), ou se o meio permanece com a cor inalterada (fermentação da lactose negativa). Transferir os tubos para uma geladeira e manter sob refrigeração por duas horas, observando em seguida se o meio permanece líquido (hidrólise da gelatina positiva) ou se adquire uma consistência firme (hidrólise da gelatina negativa). *C. perfringens* fermenta a lactose e hidrolisa a gelatina.

e.2) Teste de redução do nitrato e teste de motilidade (ágar nitrato motilidade). Com uma agulha de inoculação, inocular a cultura por picada, no centro do Ágar Nitrato Motilidade previamente desaerado, até uma profundidade distante 1cm do fundo do tubo. Incubar a 35-37ºC/24h e fazer a leitura do teste de motilidade, observando se houve migração de células para regiões fora da linha de inoculação (motilidade positiva), ou se o crescimento restringiu-se à região da picada (motilidade negativa). Para a realização do teste de redução do nitrato, adicionar aos tubos de cultura 0,1ml de cada um dos reagentes para teste de nitrato (A = solução 0,8% de ácido sulfanílico; B = solução 0,5% de alfa-naftol). Observar imediatamente se há desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura (teste positivo) e, em caso negativo, adicionar uma pitada de pó de zinco ao meio, observando se ocorre alteração de cor. Se o meio continuar com a cor inalterada, não há

nitrato presente, indicando teste positivo. Se o meio adquirir cor vermelha, há nitrato presente, indicando teste negativo. *C. perfringens* é imóvel e reduz o nitrato.

e.3) Testes de fermentação da rafinose e salicina. Esses testes são requeridos apenas para as culturas que exibirem alguma reação atípica nos testes anteriores. A partir de uma cultura de 24 horas em Meio de Tioglicolato (TGM), inocular 0,1ml em tubos de Meio de Fermentação para *C. perfringens* com rafinose e 0,1ml em tubos de Meio de Fermentação para *C. perfringens* com salicina. Incubar a 35-37°C/24h e, após a incubação, verificar se houve produção de ácido, transferindo 1ml da cultura para um tubo de ensaio e adicionando duas gotas de solução 0,04% de azul de bromotimol. O desenvolvimento de uma cor amarela no meio de cultura indica teste positivo. Em caso negativo, reincubar a cultura e verificar novamente com 48 e com 72 horas de incubação. As cepas de *C. perfringens* usualmente fermentam a rafinose e não fermentam a salicina.

f) Cálculo dos resultados

Considerar como *C. perfringens* todas as culturas com as seguintes características: fermentação da lactose (+), hidrólise da gelatina (+), redução do nitrato (+), motilidade (-). Caso uma destas reações seja atípica, verificar adicionalmente a capacidade de fermentação da rafinose (usualmente positiva) e da salicina (usualmente negativa).

Calcular o número de UFC/g ou ml em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

Exemplo. Plaqueamento em profundidade, diluição 10^{-2}, 25 colônias típicas, 10 submetidas à confirmação, oito confirmadas (80%). UFC/g ou ml = $25 x 10^{2} x 0,8 = 2,0 x 10^{3}$.

12.3. TESTE DE PRESENÇA/AUSÊNCIA *C. perfringens* em alimentos

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 34 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Labbe, 2001). Não se aplica à análise de água.

Este método objetiva verificar a presença ou ausência de *C. perfringens* em amostras de alimentos com baixas contagens e provável incidência de células injuriadas.

Cuidado. Todas as etapas do teste de presença/ausência permitem o crescimento e a produção de toxina de *C. botulinum*, não havendo distinção segura entre as culturas. Por este motivo, recomenda-se a observação dos mesmos cuidados indicados no método de contagem direta em placas.

12.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Teste presuntivo

- Tubos de Caldo de Fígado
- Ágar Selo (Ágar 2% estéril)
- Estufa incubadora regulada a 35-37°C com termômetro calibrado

Teste confirmativo

- os mesmos itens requeridos na contagem em placas

12.3.2. PROCEDIMENTO

O procedimento do teste de presença/ausência de *C. perfringens* em alimentos encontra-se descrito na Figura 12.2.

a) Inoculação. Inocular porções de aproximadamente 2g da amostra em tubos com 15-20ml de Caldo de Fígado, previamente desaerados. Cobrir a superfície do meio inoculado com um selo de 2cm de Ágar 2%.

b) Incubação. Incubar os tubos a 35-37°C por 20-24 horas e observar se ocorrem crescimento e produção de gás, com deslocamento do selo de Ágar.

c) Confirmação. A partir dos tubos com crescimento e produção de gás, estriar as culturas em placas de Ágar TSC com ou sem gema de ovo. Incubar a 35-37°C/18-24h e observar a presença de colônias típicas, descritas no item 12.2. Havendo colônias típicas, selecionar pelo menos uma para a confirmação, feita da mesma forma descrita no método de contagem direta em placas (item 12.2).

12.4. MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS Clostrídios sulfito redutores a 46°C em alimentos

A contagem de clostrídios sulfito redutores é uma simplificação da contagem de *C. perfringens* em placas, que não inclui a etapa de confirmação bioquímica. O método de análise foi definido pela Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), no item 5.9.2 do Anexo Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

12.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml
- Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem de clostrídios sulfito-redutores

- Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC)
- Sistema de geração de anaerobiose (Anaerobac da Probac do Brasil, Anaerogen da Oxoid, Anaerocult A da Merck, ou GasPak® da BD Biosciences).
- Estufa incubadora regulada a 46°C com termômetro calibrado

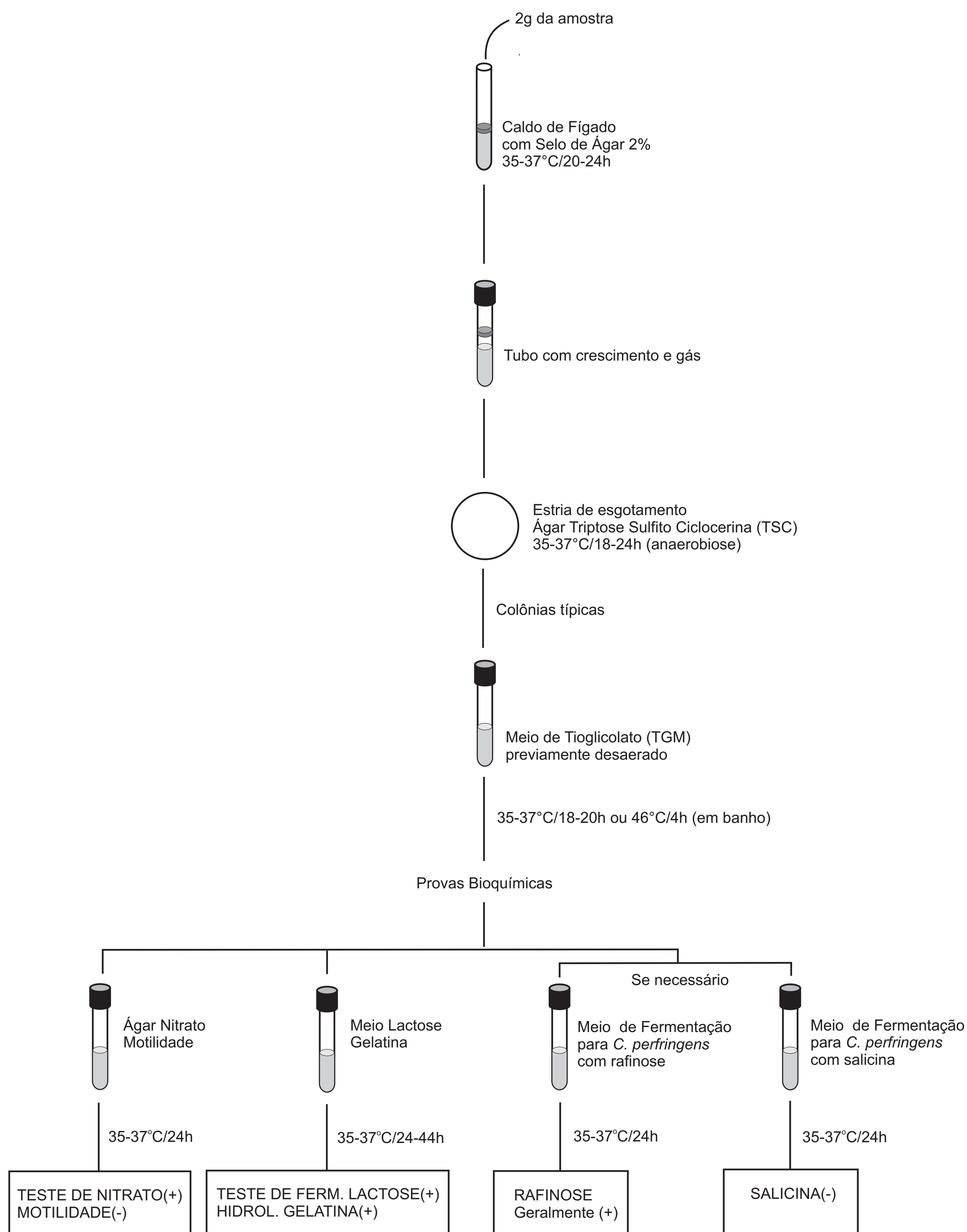


Figura 12.2. Esquema de análise para o teste de presença/ausência de *C. perfringens* em alimentos(Labbe, 2001).

12.4.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem de clostrídios sulfito-redutores em alimentos encontra-se descrito na Figura 12.3.

a) Preparação das amostras, inoculação e incubação

Para a preparação das amostras e diluições decimais seriadas, seguir as recomendações do Capítulo 2. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular em placas de Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC), plaqueamento em superfície ou em profundidade. Aguardar que as placas sequem e cobrir a superfície com uma sobrecamada de TSC.

Após a completa solidificação da sobrecamada, incubar as placas (sem inverter) a 46°C/24h, em atmosfera anaeróbia, obtida da mesma forma recomendada para incubação de *C. perfringens*.

b) Contagem das colônias presuntivas de clostrídios sulfito-redutores

Selecionar placas com 20 a 200 colônias e contar apenas as colônias pretas, típicas de clostrídios sulfito-redutores em Ágar TSC.

Cuidado. O Ágar TSC permite crescimento e produção de toxina de *C. botulinum,* não havendo distinção entre suas colônias e as colônias dos demais clostrídios sulfito-redutores (Serrano & Junqueira, 1991). Observar os mesmos cuidados recomendados para a análise de *C. perfringens* em placas (item 12.2).

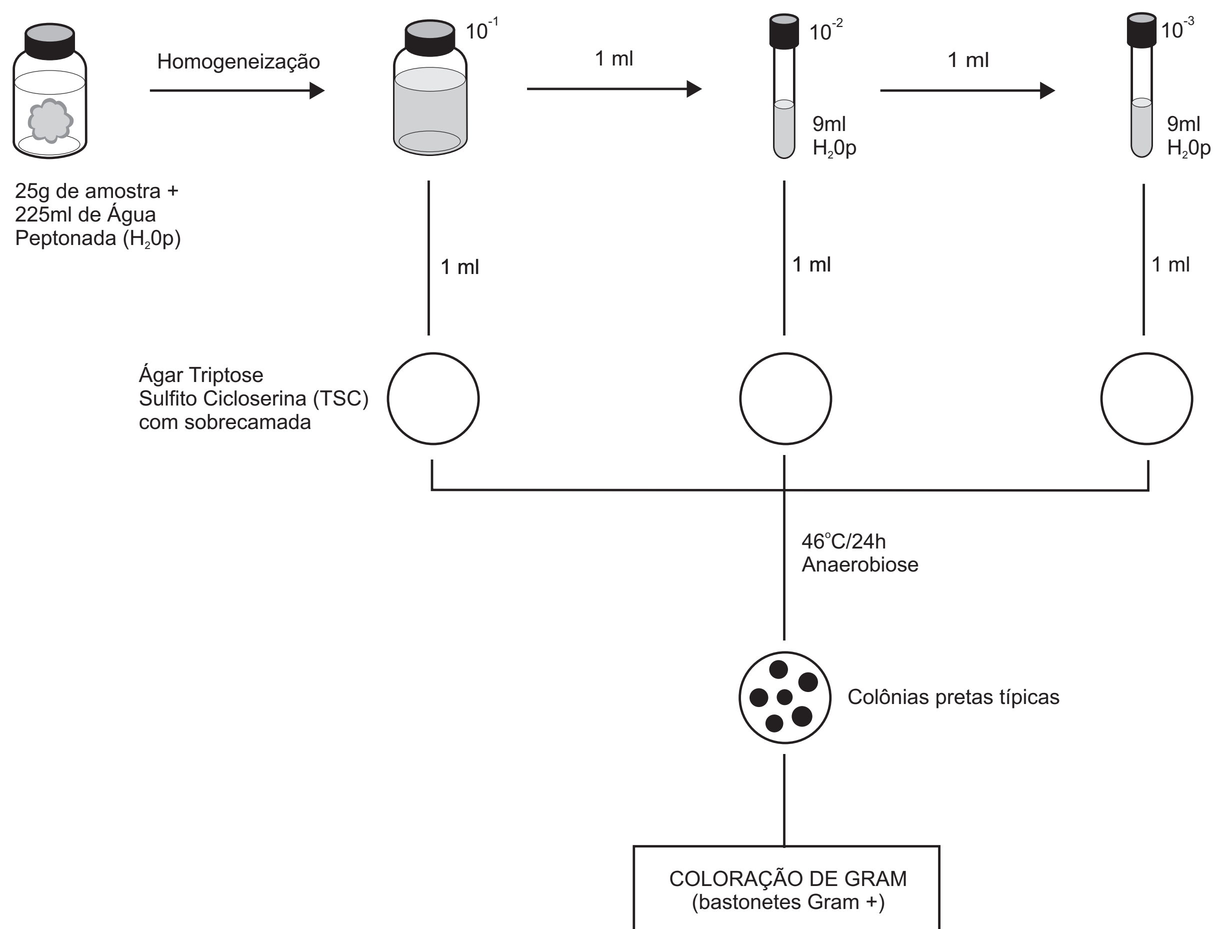


Figura 12.3. Esquema de análise para contagem de clostrídios sulfito-redutores em alimentos(ANVISA, 2001).

c) Confirmação das colônias típicas de clostrídios sulfito-redutores

Selecionar pelo menos cinco colônias típicas, preparar um esfregaço da cultura e submeter à coloração de Gram.

d) Cálculo dos resultados

Considerar como confirmadas todas as culturas de bastonetes Gram positivos. Calcular o número de UFC/g ou ml em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

Exemplo. Plaqueamento em profundidade, diluição 10^{-2}, 25 colônias típicas, 10 submetidas à confirmação, oito confirmadas (80%). UFC/g ou ml = $25x10^{2}x0,8 = 2,0x10^{3}$.

12.5. MÉTODO ISO 6461-1:1986
Esporos de clostrídios sulfito redutores em água

Método da International Standards Organization (ISO 6461-1:1986) para determinação do número mais provável de esporos de clostrídios sulfito redutores em água.

12.5.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Pipetas de 10ml para transferência dos volumes
- Água de diluição (Tampão Fosfato com cloreto de magnésio)
- Tubos com 10ml Caldo Diferencial Reforçado para Clostrídios (DRCM) em concentração dupla para inoculação de 10ml da amostra
- Tubos com 10ml Caldo DRCM em concentração simples para inocualção de 1ml da amostra ou das diluições
- Sistema de geração de anaerobiose (Anaerobac da Probac do Brasil, Anaerogen da Oxoid, Anaerocult A da Merck, ou GasPak® da BD Biosciences).
- Banho-maria a 75±5°C para choque térmico
- Estufa incubadora regulada a 37±1°C

12.5.2. PROCEDIMENTO

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Preparação das amostras

Submeter as amostras à choque térmico a 75±5°C/15min, para destruição de células vegetativas e ativação dos esporos.

b) Inoculação e incubação

Com uma pipeta de 10 ou 25ml, adicionar 10 porções de 10ml da amostra em 10 tubos contendo 10ml de Caldo Diferencial Reforçado para Clostrídios (DRCM), em concentração dupla, previamente desaerados. Não havendo necessidade de quantificar, inocular 100ml da amostra em 100ml de DRCM concentração dupla (teste de presença ausência). Incubar os tubos ou os

frascos a 37±1°C/44±4h em jarro com atmosfera anaeróbia e observar se há ocorrência de crescimento com escurecimento do meio.

Nota b.1) A inoculação de 100ml da amostra é o procedimento padrão para análise de amostras de água destinadas ao consumo humano, nas quais se espera ausência em 100ml. Para outras finalidades, pode-se inocular 50ml em 50ml de DRCM concentração dupla ou cinco porções de 10ml em 10ml de DRCM concentração dupla, ou diluições para contagem em amostras mais contaminadas (série de cinco tubos por diluição).

Nota b.2) Observar os seguintes procedimentos na preparação dos tubos de Caldo DRCM antes da inoculação: Desaerar os tubos fervendo por 10 minutos em banho-maria, com as tampas afrouxadas, e resfriando imediatamente em banho de água fria. Suplementar com a solução de citrato férrico e sulfito de sódio para Caldo DRCM, adicionando 0,4ml da solução em 10ml de DRCM concentração dupla e 0,2 ml da solução em 10ml de DRCM concentração simples.

c) Cálculo dos resultados

Considerar como clostrídios sulfito redutores todas as culturas que apresentarem escurecimento do DRCM. Determinar o Número Mais Provável (NMP) em uma tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas.

12.6. MÉTODO CETESB 1993
Esporos de *Clostridium perfringens* em água

Método da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) para determinação do número mais provável de esporos de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* em água, descrito na Norma Técnica L5.213 (CETESB, 1993).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

12.6.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Pipetas de 10ml para transferência dos volumes
- Água de diluição (Tampão Fosfato com cloreto de magnésio)
- Tubos com 10ml Caldo Diferencial Reforçado para Clostrídios (DRCM) em concentração dupla para inoculação de 10ml da amostra
- Tubos com 10ml Caldo DRCM em concentração simples para inocualção de 1ml da amostra ou das diluições
- Tubos com Leite Tornassolado para confirmação
- Sistema de geração de anaerobiose (Anaerobac da Probac do Brasil, Anaerogen da Oxoid, Anaerocult A da Merck, ou GasPak® da BD Biosciences).
- Banho-maria a 75°C para choque térmico
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C

12.6.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem de esporos de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* em água encontra-se descrito na Figura 12.4.

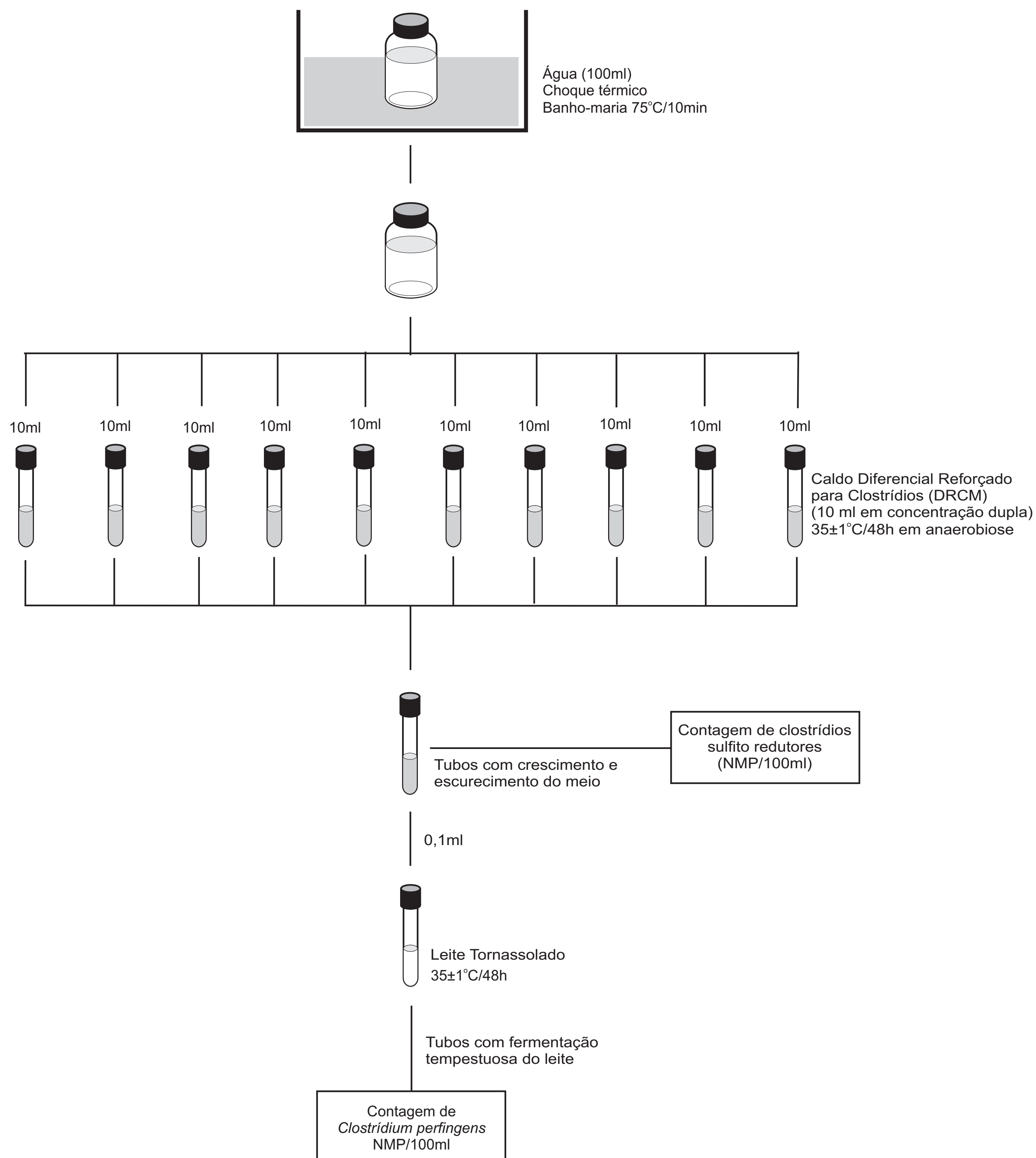


Figura 12.4. Esquema de análise para contagem de esporos de clostrídios sulfito redutores e *C. perfringens* em água pelo método CETESB (1993).

a) Preparação das amostras

Submeter as amostras à choque térmico a 75°C/10min, para destruição de células vegetativas e ativação dos esporos.

b) Teste presuntivo

Com uma pipeta de 10 ou 25ml, adicionar 10 porções de 10ml da amostra em 10 tubos contendo 10ml de Caldo Diferencial Reforçado para Clostrídios (DRCM), em concentração dupla, previamente desaerados. Incubar os tubos a 35±1°C/48h em jarro com atmosfera anaeróbia e observar se há ocorrência de crescimento com escurecimento do meio. Em caso positivo passar à confirmação. Em caso negativo, considerar como ausência de *C.perfringens* nos 100ml da amostra, porém, nos casos em que seja observado crescimento vigoroso (densa turvação), sem escurecimento do meio, considerar como resultado duvidoso e submeter à confirmação.

Nota b.1) A inoculação de 10 porções de 10ml da amostra é o procedimento padrão para análise de amostras de água destinadas ao consumo humano, nas quais se espera ausência. No caso da análise de outros tipos de água, nas quais a população possa atingir contagens superiores, recomenda-se trabalhar com diluições, inoculando-se uma série de 5 tubos para cada diluição. Nesse caso, as diluições devem ser preparadas utilizando-se como diluente a água de diluição (Tampão Fosfato com cloreto de magnésio) e a seleção das diluições depende da contagem estimada na amostra. Por exemplo, para amostras com contagem estimada na faixa de 3 a 1.000/ml, as diluições recomendadas são 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}. Havendo suspeita de contagens acima dessa faixa, deve-se inocular diluições maiores e, nos casos em que não seja possível fazer uma estimativa prévia da concentração, recomenda-se inocular um número maior de diluições, cobrindo uma faixa mais ampla.

Nota b.2) Observar os seguintes procedimentos na preparação dos tubos de Caldo DRCM antes da inoculação: Desaerar os tubos fervendo por 10 minutos em banho-maria, com as tampas afrouxadas, e resfriando imediatamente em banho de água fria. Suplementar com a solução de citrato férrico e sulfito de sódio para Caldo DRCM, adicionando 0,4ml da solução em 10ml de DRCM concentração dupla e 0,2 ml da solução em 10ml de DRCM concentração simples.

c) Confirmação

A partir de cada tubo positivo de Caldo DRCM, tomar 0,1ml da cultura, do fundo do tubo, e tranferir para tubos de Caldo Leite Tornassolado previamente desaerados, depositando o inóculo também no fundo dos tubos. Incubar os tubos a 35±1°C/48h e observar se há ocorrência das seguintes reações, confirmativas de *C. perfringens*: Coagulação tempestuosa do leite, com rompimento e deslocamento do coágulo (devida à formação de gás) e acidificação, com mudança da coloração do meio para cor de rosa.

d) Cálculo dos resultados

Considerar como clostrídios sulfito redutores todas as culturas que apresentarem escurecimento do DRCM. Considerar confirmadas como *C. perfringens* todas as culturas que apresentarem fermentação tempestuosa do leite. Determinar o Número Mais Provável (NMP) em uma tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas.

12.7. REFERÊNCIAS

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resolução RDC Número 12 de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. D.O.U. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 04 de janeiro de 2001.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC Número 275 de 22 de setembro de 2005. **Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural**. D.O.U. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

BATES, J.R., 1997. *Clostridium perfringens*. In: HOCKING, A.D. *et al.* (Eds.), **Foodborne Microorganisms of Public Health Significance**. Australian Institute of Food Science and Technology , NSW Branch, Food Microbiology Group. Printed by Trenear Printing Service Pty Limited, ISBN 0 95875155 0 5. Chapter 13, p.407-428.

CATO, E.P., GEORGE, W.L., FINEGOLD, S.M., 1986. Genus *Clostridium*. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II**. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986. p. 1141-1200.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL**. Determinação do Número Mais Provável de Clostrídios Sulfito-Redutores (*Clostridium perfringens*): Método de Ensaio**. CETESB: São Paulo, 1993. 28p.(Norma Técnica L5.213).

FDA/CFSAN. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook "Bad Bug Book"**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, December 2, 2005. http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html, acesso em 15/04/06.

FREAME, B. & FITZPATRICK, B. W. F., 1971. The use of Differential Reinforced Clostridial Medium for the isolation and enumeration of clostridia from food. In: Shapton, D. A. & Board, R. G. (ed.), **Isolation of Anaerobes**. London: Academic Press. p. 48-55.

GIBBS, B. M., FREAME, B., 1965. Methods for the recovery of Clostridia from foods. **Journal of Applied Bacteriology 28**:95-111.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. **Microrganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens**. Blackie Academic & Professional, London (ISBN 0 412 47350 X).

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. **Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN0-306-47262-7).

ISO 6461-1. **Water quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) – Part 1: Method by enrichment in liquid mesdium, 1st ed**. The International Organization for Standardization, 1986.

LABBE, R.G. *Clostridium perfringens*. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4ª ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 34, p.325-330.

MURRELL, T.G.C., 1983. Pigbel in Papua New Guinea: An Ancient Disease Rediscovered. **International Journal of Epidemiology 12(2)**:211-214.

RHODEHAMEL, E.J. & HARMON, S.M. *Clostridium perfringens*. In: US Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online,** <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>, Chapter 16, revisão de janeiro de 2001. Acesso em **08/02/2010.**

SARTORY, D.P., WALDOCK, R., DAVIES, C.E., FIELD, A.M., 2006. Evaluation of acid phosphatase as a confirmation test for *Clostridium perfringens* isolated from water. **Letters in Applied Microbiology 42:**418-424.

SERRANO, A.M., JUNQUEIRA, V.C.A., 1991. Crescimento de *Clostridium botulinum* em meios de cultura de *Clostridium perfringens* em diferentes atmosferas anaeróbias e temperaturas de incubação. **Revista de Microbiologia 22(2)**p:131-135.

Capítulo 13

Contagem de Enterococos

13.1. INTRODUÇÃO

As informações abaixo são do Release 3.2 do *The Prokaryotes Online* (Devriese *et al.*, 2000) e da 9ª Edição do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

O termo "enterococos" foi originalmente utilizado como sinônimo de "estreptococos fecais", para descrever as espécies de *Streptococus* do grupo sorológico D de Lancefield, que têm o trato intestinal como habitat natural e ocorrem em grande quantidade nas fezes humanas e de outros animais. Posteriormente, a maior parte dessas espécies foi reclassificada no gênero *Enterococcus*, criado em 1984.

O antígeno do grupo D não é confinado ao gênero *Enterococcus*, sendo encontrado também em espécies de *Streptococcus* (*S. alactolyticus*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. suis*), enquanto *E. cecorum* não apresenta esse antígeno. *S. bovis* e *S. equinus*, são "estreptococos fecais", compartilham o mesmo habitat e apresentam várias características em comum com os *Enterococcus*, apresentadas na Tabela 13.1.

No gênero *Enterococus* há espécies associadas com animais e plantas, mas apenas as espécies isoladas de humanos e animais já foram estudadas em detalhe. Alguns enteroccos são patógenos oportunistas e têm sido envolvidos em casos de infecção hospitalar, particularmente cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*.

Enterococcus são bactérias lácticas Gram positivas, não esporogênicas, catalase e oxidase negativas. Anaeróbios facultativos, fermentam carboidratos produzindo predominantemente ácido láctico, sem produção de CO_2 (metabolismo homofermentativo). A morfologia é de cocos, que ocorrem predominantemente aos pares ou pequenas cadeias. Algumas espécies são pigmentadas (*E. mundtii*, *E. casseliflavus*) ou móveis (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*).

São mesófilos e a temperatura ótima de crescimento é de 37ºC, mas a maioria consegue crescer a 10 e a 45ºC. Hidrolisam a esculina, produzem as enzimas piroglutamato aminopeptidase (PYR) e leucina aminopeptidase (LAP), crescem na presença de 40% de bile, em 6,5% de NaCl e em pH 9,6. *E. faecalis* e *E. faecium* são relativamente resistentes aos tratamentos térmicos e podem sobreviver à pasteurização do leite. A maioria também é relativamente resistente ao congelamento. Dessas características, o teste PYR e o crescimento a 10ºC e em 6,5% de NaCl permitem diferenciar os *Enterococcus* de *S. bovis* e *S. equinus*.

Tabela 13.1. Principais características do gênero *Enterococcus* e dos "estreptococos fecais" *S. bovis* e *S. equinus*.

Característica	*Enterococcus* (Euzéby, 2006)	*S.bovis* (Holt *et al.*, 1994)	*S.equinus* (Holt *et al.*, 1994)
Catalase	-	-	-
Crescimento em Ágar Bile Esculina e hidrólise da esculina	+[a]	+	+
Crescimento a 45ºC	+[a]	+/-	+
Crescimento a 10ºC	+[a]	-	-
Crescimento em pH 9,6	+	+/-	-
Crescimento em 6,5% NaCl	+[a]	-	-
Teste PYR[b]	+[a]	-	-

[a] Com algumas exceções.

[b] Teste colorimétrico rápido de atividade da enzima piroglutamato aminopeptidase, disponível comercialmete na forma de "kits".

Importância em alimentos

E. faecalis e *E. faecium* são os enterococos predominantes nas fezes humanas. *E. gallinarum* e *E. avium* predominam nas fezes de aves e *S. bovis* e *S. equinus*, nas fezes de bovinos e eqüinos, respectivamente. Esse grupo tem sido utilizado como indicador de contaminação fecal em água há muitos anos, porém, seu uso como indicador de condições higiênico-sanitárias em alimentos tem declinado, sendo raramente incluído nos critérios microbiológicos correntes. Os enterococos são mais resistentes aos fatores ambientais do que as enterobactérias, sendo essa uma das principais razões de crítica ao seu uso como indicadores. Podem sobreviver em condições nas quais as enterobactérias não sobreviveriam, logo, sua presença pode ter pouca ou nenhuma relação com a presença de patógenos entéricos. Por outro lado, sua maior resistência pode ser útil na avaliação da eficiência de processos de desinfecção de plantas de processamento ou na avaliação da qualidade higiênico-sanitária de produtos ácidos ou congelados, nos quais os coliformes ou *E. coli* podem não sobreviver (Cravem *et al.*, 1997).

Os enterococos estão entre as bactérias não esporogênicas mais resistentes ao calor e à desidratação, o que os torna deteriorantes potenciais de embutidos cárneos cozidos ou tratados termicamente Em contraste, sua presença é desejável em uma variedade de queijos, para conferir aroma e outros atributos sensoriais. Em outros tipos de queijos, fazem parte da microbiota láctica responsável pela maturação, produzindo acetaldeído, acetoína e diacetil. Algumas cepas de *E. faecalis*, *E. faecium* ou *E. durans* são adicionados como fermento láctico na produção desses queijos, para melhor padronização das características sensoriais do produto final. Algumas cepas de *E. faecium* são probióticas, prevenindo ou reduzindo o tempo de duração de diarréias em animais e humanos (Devriese *et al.*, 2000).

Métodos de análise

As informações abaixo são da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Hartman *et al.*, 2001) e, no caso da análise de água, do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005).

O método mais usado na análise de alimentos é o plaqueamento em Ágar KF *Streptococcus*, exceto para leite e seus derivados que, para inibir os lactobacilos e estreptococos lácticos, exigem meios mais seletivos. O KF é um meio seletivo diferencial, que utiliza a azida de sódio como principal agente seletivo, o cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) como agente diferencial e os carboidratos maltose (2%) e lactose (0,1%) como fontes de carbono. Nesse meio, *E. faecalis* reduz o TTC até o seu derivativo final, formazan, produzindo colônias vermelho-escuras. Outros enterococos também podem crescer, mas são redutores fracos do TTC, produzindo colônias róseas. A reação das novas espécies de *Enterococcus*, descobertas depois da criação do gênero, ainda não foi descrita.

A maioria das demais bactérias lácticas são parcial ou totalmente inibidas no Ágar KF, embora algumas cepas de *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Aerococcus* possam crescer e produzir colônias levemente róseas. A azida de sódio também pode inibir várias cepas de *S. bovis, S. equinus* e, possivelmente, diversas das novas espécies do gênero *Enterococcus.*

Alternativamente, pode ser utilizado o Ágar Gentamicina Tálio Carbonato Fluorogênico (FGTC), que substitui a azida por outros agentes seletivos e utiliza o amido e um substrato fluorogênico como agentes diferenciais. O FGTC pode elevar em duas vezes ou mais a recuperação de enterococos em alimentos, com um período de incubação bem menor (18-24h) do que o do KF (48h). Assim como o KF, ainda não foi testado com as novas espécies de *Enterococcus.*

Para a análise de produtos lácteos, o Capítulo 8 da 17º Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004) recomenda o plaqueamento em profundidade usando como meio de cultivo o Ágar Citrato Azida, com sobrecamada do mesmo meio e incubação a 37ºC/48-72h. As colônias dos enterococos são coradas de azul, pelo azul de tetrazólio presente no meio.

Uma outra recomendação para melhorar o desempenho dos meios de contagem de enterococos é a forma de preparação das amostras de desidratados para a análise. Estudos têm demonstrado que uma diluição inicial 1:1, com um período de repouso de uma hora sob refrigeração, antes de completar a diluição a 1:10, pode elevar significativamente as contagens obtidas.

A contagem pelo método do Número Mais Provável (NMP) também pode ser utilizada, embora seja mais rara na análise de alimentos. O meio de cultura é o KF *Streptococcus* na forma de caldo e a ocorrência de crescimento com viragem amarela e sem produção espuma (gás) é considerada confirmativa.

Na análise de água a contagem de estreptococos fecais e enterococos pode ser feita pela técnica da membrana filtrante, segundo método da 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005). Sua principal aplicação é a análise de água mineral ou natural, destinadas ao consumo humano, com filtração de 100ml da amostra, como recomendado pela legislação brasileira. O meio de culturade uso mais simples é o Ágar m-*Enterococcus*, seletivo diferencial, que utiliza a azida de sódio como agente seletivo para bactérias Gram negativas, o cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) como agente diferencial e a glicose, como carboidrato para fermentação. O desenvolvimento de colônias típicas é considerado confirmativo para estreptococos fecais, a diferenciação dos enterococos é opcional.

13.2. MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS
Enterococos em Alimentos

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 9 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Hartman *et al.*, 2001). Incluídas também as recomendações específicas do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004), para a análise de produtos lácteos. Não se aplica à análise de água, que segue procedimento diferenciado (Hunt & Rice, 2005).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

13.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem em placas

- Ágar KF *Streptococcus* (KF) ou Ágar Gentamicina Tálio Carbonato Fluorogênico (FGTC)
- Ágar Citrato Azida (para produtos lácteos)
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado

13.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem em placas de enterococos em alimentos encontra-se descrito na Figura 13.1.

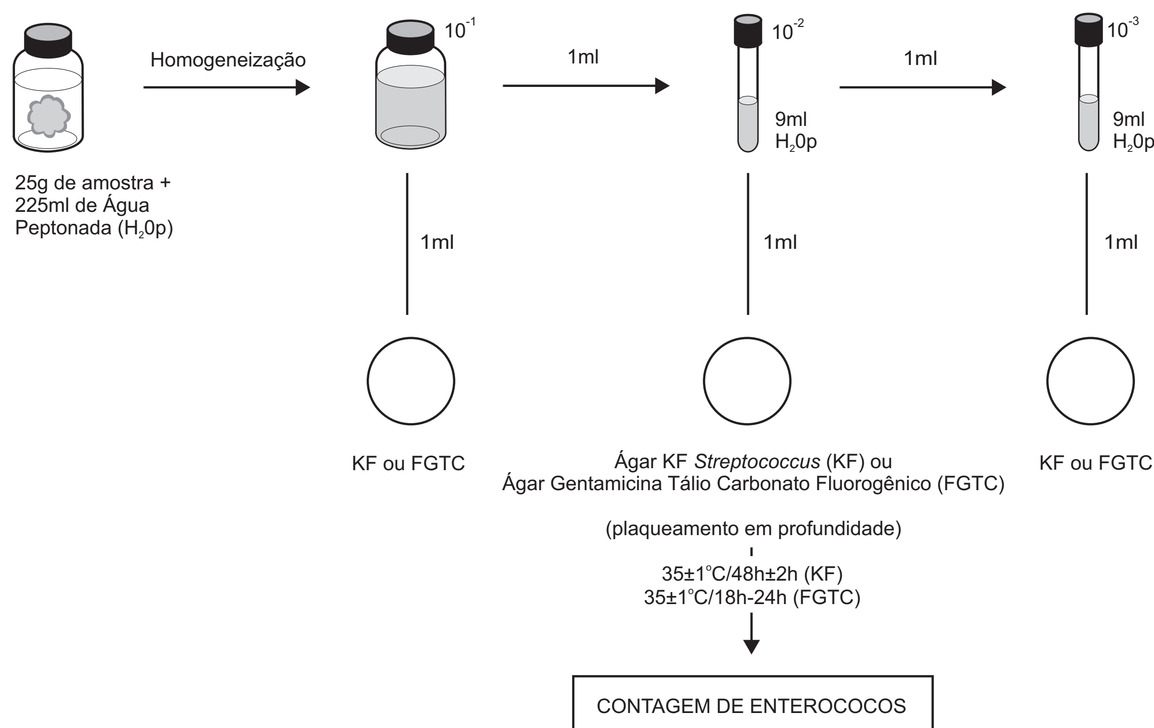


Figura 13.1. Esquema de análise para quantificação de enterococos em alimentos pelo método de contagem em placas (Hartman *et al.*, 2001).

a) Preparação da amostra e inoculação

Para a preparação da amostra e diluições seriadas, seguir as recomendações do Capítulo 2. No caso de alimentos desidratados, preparar uma diluição inicial de 1:1, homogeneizar, manter em repouso por uma hora sob refrigeração e adicionar o restante do diluente, até completar 1:10.

Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular 1ml de cada diluição, em profundidade, no Ágar KF *Streptococcus* (KF) ou no Ágar Gentamicina Tálio Carbonato Fluorogênico

(FGTC). No caso de produtos lácteos, utilizar o Ágar Citrato Azida e, depois da solidificação, cobrir com uma sobrecamada do mesmo meio.

b) Incubação

Aguardar a completa solidificação do meio e incubar nas seguintes condições:
Ágar KF: 35±1°C/48±2h
Ágar fGTC: 35±1°C/18-24h.
Ágar Citrato Azida: 37±1°C/48-72h

c) Contagem de colônias e cálculo dos resultados

No Ágar KF, selecionar placas com 25 a 250 colônias e contar apenas as colônias típicas, que são vermelhas ou róseas. Determinar o número de UFC/g ou ml multiplicando o número de colônias típicas pelo inverso da diluição.

No Ágar fGTC as colônias com halo transparente (hidrólise do amido) sob luz visível e com fluorescência azulada brilhante sob luz ultravioleta, ondas longas na faixa de 365nm (degradação do substrato fluorogênico) são indicativas de *S. bovis.* Colônias fluorescentes sem hidrólise do amido são indicativas de *E. faecium* e biótipos relacionados. Colônias sem fluorescência e sem hidrólise de amido são indicativas de *E. faecalis, E. avium, S. equinus* e outros estreptococos. Para a enumeração total dos enterococos, contar as colônias de todos os tipos e determinar o número de UFC/g ou ml multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição.

No Ágar Citrato Azida, selecionar placas com 25 a 250 colônias e contar apenas as colônias típicas, que são azuis. Determinar o número de UFC/g ou ml multiplicando o número de colônias típicas pelo inverso da diluição.

13.3. MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)
Enterococos em Alimentos

O método do NMP é recomendado (mas não descrito) no Capítulo 9 da 4° Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Hartman *et al.*, 2001). A descrição encontra-se no *Difco & BBL Manual* (Zimbro & Power, 2003). Não se aplica à análise de água, que segue procedimento diferenciado (Hunt & Rice, 2005).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

13.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem pelo NMP

- Caldo KF *Streptococcus*
- Reagentes para coloração de Gram
- Estufa incubadora regulada a 35±1ºC com termômetro calibrado

13.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem de enterococos em alimentos pelo método do NMP encontra-se descrito na Figura 13.2.

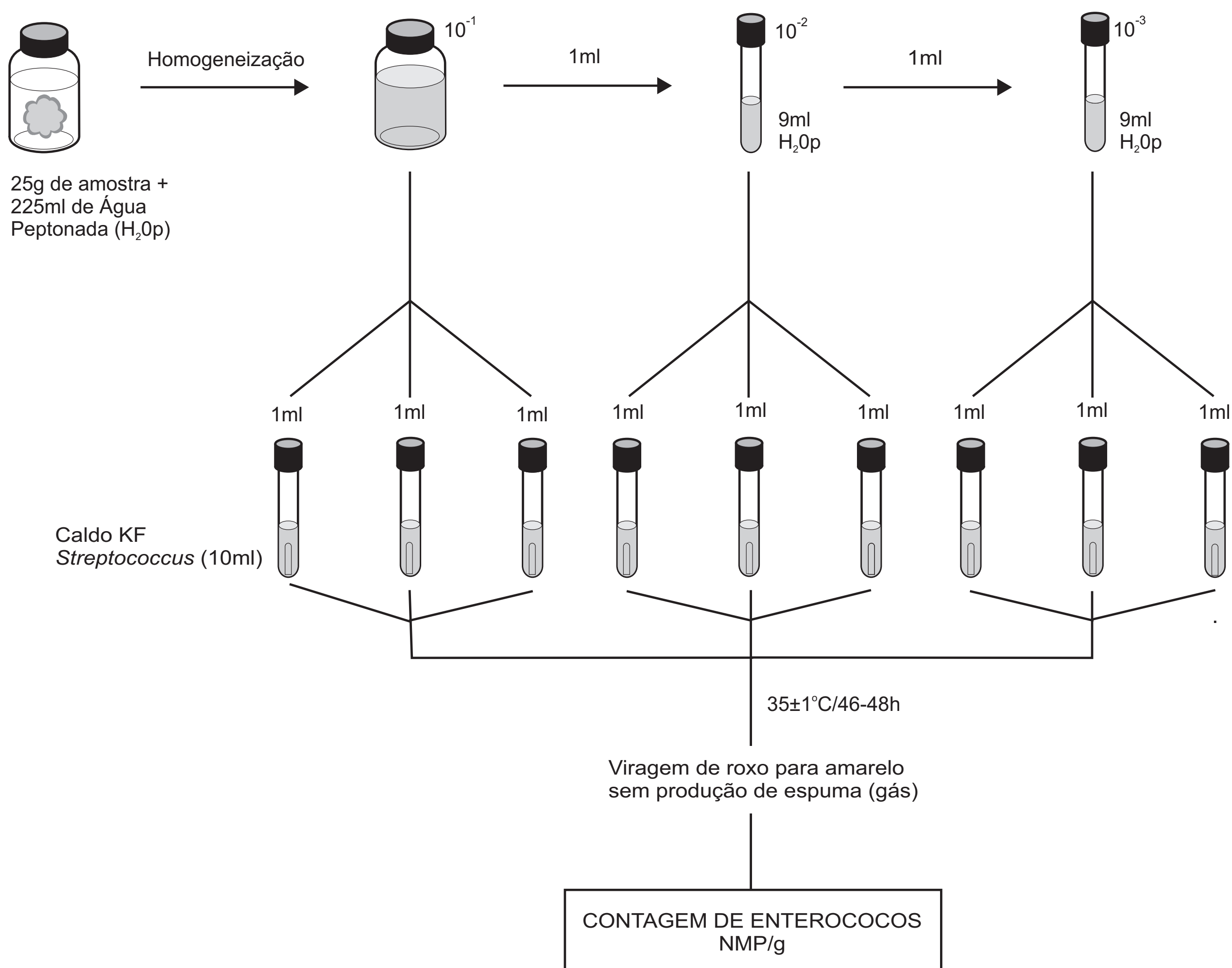


Figura 13.2. Esquema de análise de enterococos em alimentos pelo método do NMP.

a) Preparação da amostra e diluições seriadas. Seguir as recomendações do Capítulo 2. No caso de alimentos desidratados, preparar uma diluição inicial de 1:1, homogeneizar, manter em repouso por uma hora sob refrigeração e adicionar o restante do diluente, até completar 1:10.

b) Inoculação. Inocular três alíquotas de 1ml das três primeiras diluições da amostra, em uma série de três tubos com 10ml de caldo KF *Streptococcus*. Se as contagens esperadas são baixas, inocular alíquotas maiores, seguindo as orientações do Capítulo 4.

c) Incubação. Incubar os tubos a 35±1°C/46-48h, com as tampas ligeiramente afrouxadas. Observar se ocorre crescimento com viragem do indicador, alterando a cor do meio de roxo para amarelo, sem produção de espuma (gás), indicativo de enterococos.

d) Confirmação. A confirmação só é necessária se houver produção de espuma. Nesse caso, verificar a morfologia e coloração de Gram das culturas e considerar como enterococos todas as culturas de cocos Gram positivos em pares ou pequenas cadeias.

e) Cálculo dos resultados. Anotar o número de tubos positivos e determinar o NMP/g conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

13.4. MÉTODO DA MEMBRANA FILTRANTE
Enterococos em Água

Método da 21ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pela técnica da filtração em membrana. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

13.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Conjunto de filtração previamente esterilizado
- Pinças para transferência das membranas, mergulhadas em etanol
- Membranas de 47mm de diâmetro, porosidade de 0,45mm, brancas e quadriculadas
- Provetas de 100ml estéreis
- Água de diluição (Tampão Fosfato com cloreto de magnésio)
- Placas de Petri com Ágar m-Enterococos
- Estufa incubadora regulada a 35±0,5°C com termômetro calibrado

13.4.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem de enterococos em água pelo método da membrana filtrante encontra-se descrito na Figura 13.3.

a) Preparação da amostra e filtração. Seguindo os procedimentos descritos no Capítulo 3, filtrar 100ml da amostra em membrana de 47mm de diâmetro, porosidade de 0,45μm, brancas e quadriculadas.

> **Nota a.1)** A filtração de 100ml da amostra é o procedimento padrão para análise de água mineral, na qual se espera ausência, sendo esse o volume mínimo exigido pela legislação brasileira. No caso da análise de águas não destinadas ao consumo humano, nas quais a população possa atingir contagens superiores, a técnica de filtração não é a mais recomendada, uma vez que objetiva concentrar os microrganismo. Entretanto, na indisponibilidade de outra técnica no laboratório, pode ser utilizada, selecionando-se o volume em função da contaminação estimada na amostra, de forma a resultar em placas com contagens na faixa de 20 a 200 colônias. Pode ser feito o fracionamento dos 100ml

em duas porções de 50ml, 4 porções de 25ml ou 3 porções de 70, 25 e 5ml, respectivamente, ou, se necessário, ser feita a filtração de diluições.
Nota a.2) No preparo de diluições utilizar como diluente a água de diluição (Tampão Fosfato com cloreto de magnésio) e pipetas com capacidade de, no máximo, 10% dos volumes a serem transferidos. As diluições podem ser preparadas transferindo-se 9ml (da amostra ou diluição anterior) para 90ml do diluente ou 1ml (da amostra ou diluição anterior) para 9 ml do diluente.
Nota a.3) Quando o volume a ser filtrado for menor do que 20ml, adicionar ao copo do conjunto de filtração cerca de 20-30ml de água de diluição (Tampão Fosfato com cloreto de magnésio), antes da adição da amostra. Não é necessária uma medida exata do volume de tampão, cuja função é aumentar o volume a ser filtrado, facilitando uma melhor distribuição dos microrganismos na membrana.

b) Incubação e contagem das colônias. Transferir a membrana para uma placa de Ágar m-Enterococos e incubar 35±0,5°C/48h, invertida. Contar apenas as colônias típicas (vermelho claro ou escuro) e selecionar para contagem as placas com número total de colônias inferior a 200 e número de colônias típicas entre 20 e 60.

c) Cálculo dos resultados . Nas situações normais, em que são filtrados 100ml da amostra, o número total de colônias na placa não ultrapassou 200 e o número de colônias típicas manteve-se na faixa recomendada de 20 a 60, o número de unidades formadoras de colônias (UFC)/100ml da amostra é dado diretamente pelo número de colônias presentes.

Se foi filtrado um volume diferente de 100ml, mas o número total de colônias na placa não ultrapassou 200 e o número de colônias típicas ainda se manteve na faixa recomendada, considerar o volume no cálculo do resultado, lembrando que, se foram utilizadas diluições, 1ml da diluição 10^{-1} corresponde a 0,1ml da amostra original, 1ml da 10^{-2} corresponde a 0,01ml da amostra original e assim subseqüentemente. Nesse caso, o número de UFC/100ml é dado pela seguinte fórmula:

UFC/100ml = N° de colônias típicas x 100/volume da amostra original que foi filtrado.

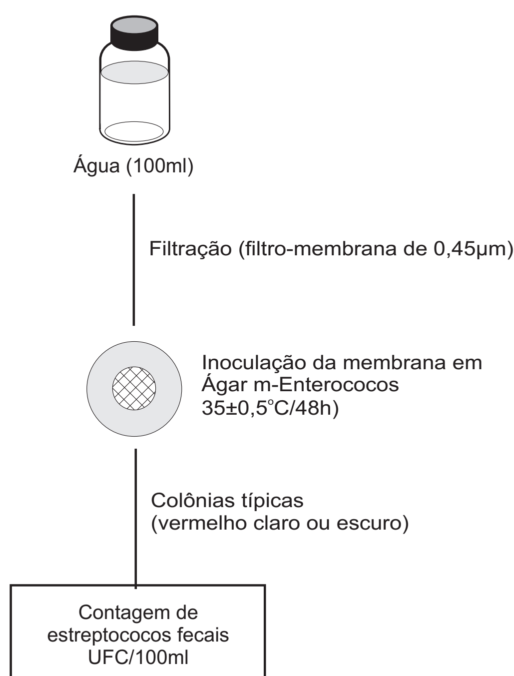


Figura 13.3. Esquema de análise de enterococos em água pelo método da membrana filtrante (Hunt & Rice, 2005).

Se foi filtrado mais de um volume da amostra e placas correspondentes a mais de um volume se apresentaram em condições adequadas para contagem, considerar a soma das colônias nas várias placas e a soma dos respectivos volumes no cálculo do resultado, de acordo com a fórmula abaixo:

UFC/100ml = Soma do Nº colônias típicas nas várias placas x 100/soma dos volumes correspondentes às placas contadas.

Se não houver desenvolvimento de colônias típicas em nenhuma placa, expressar o resultado como ausência ou menor que 1/100ml.

Se nenhuma placa apresentar contagem acima de 20 colônias típicas, utilizar o número obtido no cálculo do resultado.

Se as placas apresentarem mais de 60 colônias típicas, efetuar a contagem desde que o número total de colônias na placa não exceda 200.

Quando a placa contiver um número de colônias superior a 200, mas ainda for possível efetuar a contagem das colônias típicas, contar e utilizar o número obtido nos cálculos. Relatar o resultado como maior ou igual (≥) o valor obtido.

Quando a placa contiver um número de colônias muito superior a 200, impedindo a contagem, relatar o resultado como presença ou ausência, dependendo da presença de colônias típicas.

Nota c.1) Os resultados obtidos não diferenciam os membros do gênero *Enterococcus* e os membros do gênero *Streptococcus*.

13.5. REFERÊNCIAS

CRAVEN, H.M., EYLES, M.J. & DAVEY, J.A. Enteric indicator organisms in foods. In: HOCKING, A.D. *et al.*(eds), **Foodborne Microrganisms of Public Health Significance.** Australian Institute of Food Science and Technology Inc., Sydney, Australia, 1997. Chapter 5, p.139-168.

DEVRIESE, L., BAELE, M., BUTAYE, P. The Genus *Enterococcus*. In: DWORKIN, M. *et al.* (eds.), **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.2, 25/07/2000, Springer-Verlag, New York. http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm, acesso em 04/05/2006.

EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W. & GREENBERG, A.E. (Eds). **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed**. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005.

EUZÉBY, J.P., 2006. **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**. Disponível em <http://www.bacdico.net>, acesso em 20/04/2006.

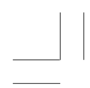
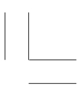
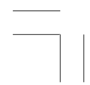
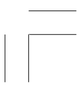
FRANK, J.F. & YOUSEF, A.E. Tests for groups of microrganisms. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F., **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, **17th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 8, p.227-247, Section 8.080.

HARTMAN, P.A., DEIBEL, R.H. & SIEVERDING, L.M. Enterococci. In: DOWNES, F. P. & K. ITO (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 9, p.83-87.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9a Ed**. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

HUNT, M.E. & RICE, E.W. Microbiological examination. In: EATON *et al.* (Eds), **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed**. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9230, p.9.86 – 9.90.

ZIMBRO, M.J. & POWER, D.A. **Difco & BBL Manual**. Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA, 2003. p.279-280.

Capítulo 14

Contagem de Bactérias Lácticas

14.1. INTRODUÇÃO

Bactérias láticas são um grupo que tem como principal característica a fermentação de carboidratos com produção de ácido láctico. Originalmente, esse grupo incluia quatro gêneros de grande importância em alimentos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Gradativamente, esses gêneros foram subdivididos nos novos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Euzéby, 2006a, Dsmz, 2006, Hall *et al.*, 2001), cujas principais características encontram-se sumariadas no Quadro 14.1.

Todas são Gram positivas, não esporogênicas, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase negativas. O metabolismo de carboidratos pode ser homofermentativo, resultando primordialmente em ácido láctico, ou heterofermentativo, resultando em ácido láctico, CO_2 e outros produtos de fermentação. As exigências nutricionais são complexas, a maioria dependendo da presença de vitaminas, carboidratos e outros fatores para o crescimento. Acetato e tween 80 são estimuladores do crescimento para a maioria, sendo normalmente adicionados aos meios de isolamento.

Leuconostoc van Tieghem 1878

Informações de Euzéby (2006b), Björkroth & Holzapfel (2003) e Holt *et al.* (1994).

É um dos gêneros originais de bactérias lácticas e algumas espécies de importância em alimentos foram reclassificadas nos novos gêneros *Oenococcus* e *Weissella.* Nos alimentos podem ser encontrados como deteriorantes ou como coadjuvantes de fabricação de produtos fermentados. *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* é freqüentemente incorporado em produtos lácteos, para acentuar o "flavor" através da produção de diacetil. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, embora não seja a espécie dominante, exerce um papel importante no início da fermentação de chucrute e pepinos fermentados. Em sucos de frutas, ao contrário, os leuconostocs são deteriorantes, provocando alteração do sabor, devido à produção de acetoína e diacetil. Também participam da deterioração de carnes embaladas à vácuo ou em atmosferas modificadas, provocando limosidade superficial e aroma de fermentado. *L. carnosum* e *L. gelidum* são deteriorantes de presunto fatiado embalado à vácuo, onde provocam pontos de coloração amarela. Na produção de açúcar, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* provoca perda de rendimento, consumindo até 5% da sacarose da cana por dia, entre a colheita e o processamento. Também produz a goma dextrana, que interfere nas etapas de refino.

A morfologia é de cocos, imóveis, freqüentemente lenticulares, ocorrendo em pares ou pequenas cadeias. Requerem aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, ácidos nucleicos, vitaminas e carboidratos fermentáveis para o crescimento. São heterofermentativos e crescem melhor em meios neutros ou levemente ácidos, sendo menos acidúricos do que os lactobacilos. A temperatu-

ra ótima é de 20 a 30°C, com mínimo por volta de 5°C, exceto os da carne (*L. carnosum* e *L. gelidum*), que são psicrotróficos, podem crescer a 1°C e não crescem a 37ºC. A maioria das cepas é aerotolerante mas cresce melhor em condições microaerófilas.

Quadro 14.1. Princiais características da bactérias lácticas associadas com alimentos (Euzéby, 2006b, Holt *et al.*, 1994).

Característica	*Carnobacterium*	*Enterococcus*	*Lactococcus*	*Lactobacillus*	*Leuconostoc*	*Pediococcus*	*Streptococcus*	*Tetragenococcus*	*Vagococcus*	*Weissella*
Forma	Bastonetes	Cocos	Cocos	Bastonetes	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos ou bastonetes
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidade	+/-	+/-	-	-[a]	-	-	-	-	+/-	-
Catalase	-	-[b]	-	-[b]	-	-	-	-	-	-
Temperatura ótima (°C)	30	37	30	30-40	20-30	25-40	37	NR	25-35	NR
Crescimento a 10°C	+	+[a]	+[a]	NR	+	-[a]	-	-	+[c]	+/-
Crescimento a 45°C	-	+[a]	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-[c]	+/-
Crescimento em pH 9,6	NR	+	-	-	NR	+/-	+/-	NR	-	NR
Crescimento em 6,5% de NaCl	NR	+[a]	+/-	NR	+/-	+/-	+/-	+	+[c]	+
Crescimento em 40% de bile	NR	+	+/-	NR	NR	+/-	+/-	NR	NR	NR
Produção de gás (Homo/Heterofermentação)	+ (pouco)	-	-	+/-	+	-	-	-	-	+
PYR (Pirrolidonil arilamidase)	NR	+[a]	+[a]	NR	-	-	+/-	-	+/-	-[c]
LAP (Leucina arilamidade)	NR	+[a]	+[a]	NR	-	+	+[b]	+	+	-[c]
Teste de bile esculina	NR	+	+[a]	NR	+/-	+	+/-	+	+/-	NR
Sensibilidade à vancomicina	NR	S[a]	S	NR	R	R	S	S	S[c]	R[c]

Símbolos: + = positivo, - = negativo, +/- = varia entre as espécies, NR = não relatado.
[a] Com algumas exceções.
[b] Pode apresentar atividade de pseudocalalase.
[c] Característica não verificada para todas as espécies.

Pediococcus Balcke 1884

Informações de Euzéby (2006b), Holzapfel *et al.* (2005) e Holt *et al.* (1994).

É um dos gêneros originais de bactérias lácticas e algumas espécies de importância em alimentos foram reclassificadas no novo gênero *Tetragenococcus*. Nos alimentos podem ser encontrados como deteriorantes ou como coadjuvantes de fabricação de produtos fermentados. *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus* e *P. dextrinicus* são associados à fermentação de chucrute, pepinos, azeitonas, ensilagens de forragem e outros produtos de origem vegetal. Em vários países da Ásia são adicionados a substratos ricos em amido, para a produção de bebidas alcoólicas. Em produtos cárneos como linguiças curadas, *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* também parecem participar do processo de fermentação e maturação. *P. damnosus* é associado à deterioração de cervejas e vinhos.

Os pediococos são cocos Gram positivos imóveis, que se dividem em dois planos e em ângulos retos, formando tétrades (agrupamento de quatro células). As células nunca são alongadas, nunca formam cadeias e também podem ocorrer em pares, especialmente entre o início e o meio da fase logarítmica de crescimento. Células isoladas são mais raras, mas podem ocorrer. São homofermentativos e catalase negativos, mas algumas cepas apresentam atividade de pseudocatalase, em meios contendo baixa concentração de carboidratos. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25 e 40ºC, algumas espécies podem crescer a 45ºC mas não crescem a 10ºC, com raras exceções.

Streptococcus Rosenbach 1884

Informações de Euzéby (2006b), Holt *et al.* (1994) e Sneath *et al.* (1986).

É um dos gêneros originais de bactérias lácticas, mas a maioria das espécies de importância em alimentos foram reclassificadas nos novos gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus*. Uma espécie, *S. thermophilus,* é amplamente utilizada como fermento láctico na produção de iogurtes, leites fermentados e queijos. *S. uberis* e *S. dysgalactiae* provocam mastite em gado leiteiro, contaminando o leite cru (Lafarge *et al.*, 2004). *S. bovis* e *S. equinus* são habitantes normais do trato intestinal de bovinos e equinos, respectivamente, sendo considerados “estreptococos fecais” e apresentando várias características em comum com os *Enterococcus* (vide Capítulo 13).

Os estreptococos são esféricos ou ovóides, imóveis, geralmente arranjados aos pares ou cadeias. Anaeróbios facultativos, algumas espécies exigem CO_2 para crescimento e algumas são anaeróbias estritas. O metabolismo de carboidratos é homofermentativo, com requerimentos nutricionais complexos e variáveis. A temperatura ótima de crescimento é 37ºC e a máxima e a mínima variam entre as espécies. *S. thermophilus* é anaeróbio facultativo, termodúrico e resiste à pasteurização clássica (60ºC/30min). Cresce rapidamente em leite a 45ºC, com temperatura mínima entre 19-21ºC e máxima de 52ºC. Não cresce em 40% de bile, em 4% de NaCl ou em pH 9,6.

Lactobacillus Beijerinck 1901

Informações de Hammes & Hertel (2003), Holt *et al.* (1994) e Sneath *et al.* (1986).

É um dos gêneros originais de bactérias lácticas e várias espécies de importância em alimentos foram reclassificadas nos novos gêneros *Carnobacterium* e *Weissella*. São bactérias extremamente úteis, muitas delas reconhecidas como probióticas, incluindo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. Nos alimentos, podem ser utilizadas como coadjuvantes de fabricação de inúmeros produtos fermentados: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é utilizado como fermento láctico na produção de iogurtes e leites fermentados. *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* em combinação com *Streptococcus thermophilus*, são utilizados como fermento na produção de queijos. *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei* são associados à fermentação de chucrute

e pepinos. *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, em associação com *Staphylococcus* e *Micrococcus*, são utilizados como fermento na fabricação de produtos cárneos fermentados. Em contraste, também são deteriorantes de produtos ácidos, incluindo *L. fructivorans* e *L. brevis* em maionese e outros molhos para saladas, *L. fructivorans* e *L. plantarum* em produtos vegetais e várias espécies em sucos de frutas, refrigerantes e outros alimentos.

A morfologia é de bastonetes, imóveis (com raras exceções), usualmente regulares e de tamanho variado. Algumas espécies formam pequenos cocobacilos, que lembram *Leuconostoc*. Algumas espécies apresentam variação na morfologia, como é o caso de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que pode formar bastonetes regulares ou longas espirais. A forma de espirais também é encontrada em *L. curvatus*, cujas células são curvas.

Algumas espécies apresentam atividade de catalase ou pseudocatalase em meios contendo sangue. Podem ser homofermentativos, produzindo mais de 85% de ácido láctico a partir da glicose, ou heterofermentativos, produzindo ácido láctico, CO_2, etanol e/ou ácido acético. Requerem aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, derivativos de ácidos nucleicos, vitaminas, sais e carboidratos fermentáveis para o crescimento. A maioria cresce melhor em condições anaeróbias ou microaerófilas. A temperatura ótima de crescimento é de 30-40ºC e o crescimento a 15 ou 45ºC varia entre as espécies. São acidúricos, crescendo em pH 4,5 e não em pH 9,0.

Enterococcus (ex Thiercelin & Jouhaud 1903) Schleifer & Kilpper-Bälz 1984

Informações de Euzéby (2006b), Devriese *et al.* (2000) e Holt *et al.* (1994).

Esse gênero foi criado em 1984 para acomodar os anteriormente chamados "estreptococos fecais" do grupo sorológico D de Lancefield, que têm o trato intestinal como habitat natural e ocorrem em grande quantidade nas fezes humanas e de outros animais. São microrganismos indicadores, utilizados para avaliar a eficiência de desinfecção de plantas de processamento ou a qualidade higiênico-sanitária de produtos ácidos ou congelados. Nos alimentos podem ser deteriorantes de embutidos cárneos cozidos ou tratados termicamente, mas, em contraste, sua presença é desejável em uma variedade de queijos maturados, para conferir aroma e outros atributos sensoriais (produção de acetaldeído, acetoína e diacetil). Algumas cepas de *E. faecalis*, *E. faecium* ou *E. durans* são adicionados como fermento láctico na produção de queijos, para melhor padronização das características sensoriais do produto final. Algumas cepas de *E. faecium* são probióticas, prevenindo ou reduzindo o tempo de duração de diarréias em animais e humanos.

Anaeróbios facultativos, fermentam carboidratos produzindo predominantemente ácido láctico, sem produção de CO_2 (metabolismo homofermentativo). A morfologia é de cocos, que ocorrem predominantemente aos pares ou pequenas cadeias. Algumas espécies são pigmentadas (*E. mundtii*, *E. casseliflavus*) ou móveis (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*). São mesófilos e a temperatura ótima de crescimento é de 37ºC, mas a maioria consegue crescer a 10 e a 45ºC. Hidrolisam a esculina, produzem as enzimas piroglutamato aminopeptidase (PYR) e leucina aminopeptidase (LAP), crescem na presença de 40% de bile, em 6,5% de NaCl e em pH 9,6. *E. faecalis* e *E. faecium* são relativamente resistentes aos tratamentos térmicos e podem sobreviver à pasteurização do leite. A maioria também é relativamente resistente ao congelamento.

Lactococcus Schleifer *et al.* 1986

Informações de Euzéby (2006b), Teuber & Geis (2002) e Holt *et al.* (1994).

Esse gênero foi criado em 1986, para acomodar espécies anteriormente classificadas como *Streptococcus* (*S. lactis*, *S. raffinolactis*, *S. cremoris*, *S. garvieae*, *S. plantarum*) e *Lactobacillus* (*L. hordniae* e

L. xylosus). São isolados predominantemente de leite e produtos lácteos, onde ocorrem naturalmente. *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis* são utilizados como fermento na produção de vários produtos lácteos fermentados.

Os lactococos formam células esféricas ou ovais, arranjadas em pares ou pequenas cadeias, imóveis. São microaerófilos, homofermentativos, a temperatura ótima é de 30ºC, crescem a 10ºC e algumas espécies também a 45ºC. A maioria pertence ao grupo sorológico N de Lancefield, principal característica que os diferencia dos estreptococos.

Carnobacterium Collins *et al.* 1987

Informações de Hammes & Hertel (2003), Euzéby (2003) e Holt *et al.* (1994).

Esse gênero foi criado em 1987, para acomodar espécies anteriormente classificadas como *Lactobacillus* (*L. carnis*, *L. divergens* e *L. piscicola*). São deteriorantes de alimentos, isolados predominantemente de embutidos cárneos embalados à vácuo, podendo também ocorrer em peixes, leite e queijos. *C. maltaromaticum* provoca odor de malte em leite e *C. viridans* é responsável pelo esverdeamento de salsichas e linguiças embaladas à vácuo. Algumas cepas de *C. maltaromaticum* (anteriormente classificadas como *C. piscicola*) são patogênicas para peixes.

Carnobacterium forma bastonetes finos, retos ou ligeiramente arqueados, isolados, aos pares ou pequenas cadeias. Heterofermentativos atípicos, produzem pequenas quantidades de CO_2 e apresentam requerimentos nutricionais relativamente complexos. São muito semelhantes aos *Lactobacillus*, mas, ao contrário desses, não crescem no Ágar Rogosa SL (que contem 2,5% de acetato de sódio). Também não são acidúricos (não crescem em pH 4,5 ou menor) e são favorecidos em pH neutro ou alcalino (6,8 a 9,0). Não crescem em 8% de NaCl ou a 45°C mas crescem a 10°C e, eventualmente, a 0°C. Algumas espécies são móveis (*C. alterfunditum*, *C. funditum*, *C. inhibens* e *C. mobile*). *C. maltaromaticum* tem temperatura ótima de 30ºC, (mínima de 6 e máxima de 40ºC), pH ótimo entre 6,0 e 7,0 e cresce no Ágar Tripticase de Soja (TSA), formando colônias menores do que 2mm após 48 horas de incubação à 25°C.

Vagococcus Collins *et al.* 1990

Informações de Euzéby (2006b), Euzéby (2004a) e Holt *et al.* (1994).

Esse gênero foi criado para acomodar, inicialmente, uma nova espécie de bactéria, com todas as características de *Lactococcus*, porém, móvel com flagelos peritríquios (*V. fluvialis*). Outras quatro novas espécies, também muito semelhantes aos lactococos, foram descobertas posteriormente, mas, ao contrário dos lactococos, raramente associadas com alimentos. Os vagococos têm sido isolados de diversos espécimes clínicos, de animais e humanos. *V. carniphilus* foi isolado de carne bovina. A patogenicidade dessas bactérias, sua participação no desenvolvimento de doenças ou sua importância em alimentos ainda são desconhecidas.

As características fenotípicas do gênero *Vagococcus* também são pouco conhecidas, porque a descrição das espécies não contempla as mesmas características, as técnicas utilizadas não são idênticas e o número de cepas estudadas é muito pequeno. De maneira geral, os vagococos são esféricos, ovais ou irregulares, isolados, em pares ou pequenas cadeias. Homofermentativos, com temperatura ótima na faixa de 25 a 35ºC, geralmente crescem a 10ºC mas não a 45ºC, com raras exceções.

Tetragenococcus Collins *et al.* 1993

Informações de Euzéby (2006b) e Holzapfel *et al.* (2005).

Esse gênero foi criado em 1993 para acomodar uma espécie halofílica anteriormente classificadas como *Pediococcus* (*P. halophilus*). Novas espécies foram posteriormente descobertas (*T.*

muriaticus, T. koreensis) e, em 2005, uma espécie anteriormente classificada como *Enterococcus* (*E. solitarius*) foi também alocada no gênero. Os tetragenococos são caracterizados pela tolerância ao sal, crescendo em concentrações maiores do que 10% de NaCl (*T. halophilus* cresce em mais de 18%). Estão envolvidos na maturação de presunto curado e na fermentação láctica de alimentos como molhos de soja fermentado, "shottsuru" (molho de peixe fermentado), "kimchi" (vegetais fermentados) e outros fermentados com alto teor de sal.

As características morfológicas e bioquímicas dos tetragenococos são as mesmas dos pediococos, dos quais são diferenciados principalmente pela natureza halofílica. Os tetragenococos também são menos tolerantes à acidez do que os pediococos, crescendo em valores mais altos de pH (até 9,0) mas não em pH 5,0 ou menor.

Weissella Collins *et al.* 1994

Informações de Euzéby (2006b), Euzéby (2004b) e Björkroth & Holzapfel (2003).

Esse gênero foi criado em 1994, para acomodar espécies anteriormente classificadas como *Leuconostoc* (*L. paramesenteroides*) e *Lactobacillus* (*L. confusus, L. halotolerans, L. kandleri, L. minor* e *L. viridescens*). Nos alimentos podem ser encontradas como deteriorantes ou como coadjuvantes de fabricação de produtos fermentados. *W. cibaria* está presente em pratos tradicionais como o "tapai" da Malásia (preparação culinária fermentada e açucarada à base de mandioca ou de arroz) e o "kimchi"coreano (que também contém *W. koreensis*). *W. confusa* é isolada de ensilagens de forragem. *W. paramesenteroides* é abundante nos vegetais frescos e parece desempenhar um papel importante nas primeiras fases da fermentação de ensilagens. *W. halotolerans*, *W. hellenica* e *W. viridescens* são isoladas freqüentemente de carnes secas, carnes defumadas e salsichões secos. *W. viridescens* pode provocar esverdeamento em produtos cárneos. *W. minor* tem sido isolada de equipamentos utilizados na indústria láctea.

As weissellas formam bastonetes curtos, cocobacilos ou cocos ovais, isolados, em pares ou pequenas cadeias, imóveis. Catalase negativas, *W. paramesenteroides* pode produzir pseudocatalase em meios com baixa concentração de glicose. São anaeróbias facultativas ou microaerófilas, heterofermentativas, crescem a 15ºC e podem crescer ou não 10 ou a 45ºC. Requerem aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, ácidos nucleicos, vitaminas e carboidratos fermentáveis para o crescimento. Crescem muito pobremente no Caldo Tripticase de Soja (TSB), mas o crescimento é bom em Caldo MRS (de Man, Rogosa & Sharpe), onde a produção de gás pode ser observada em tubo de Durham, após 48 a 72 horas de incubação.

Oenococcus Dicks *et al.* 1995

Informações de Björkroth & Holzapfel (2003).

Esse gênero foi criado em 1995 para acomodar uma espécie anteriormente classificada como *Leuconostoc* (*L. oenos*). A única espécie do gênero, *O. oeni* (o nome específico foi corrigido) ocorre naturalmente em polpas de frutas e habitats relacionados. É utilizada na fabricação de alguns tipos de vinhos, para converter ácido málico em ácido láctico (fermentação maloláctica). Essa fermentação secundária contribui para o desenvolvimento do aroma, textura e "flavor" dos vinhos onde é empregada. Em outros tipos de vinhos pode ser detrimental, conferindo sabor estranho e criando condições favoráveis à deterioração por outros tipos de bactérias.

Oenococcus apresenta todas as características típicas dos leuconostocs, mas, ao contrário desses, cresce melhor em meios de cultura ácidos (pH inicial entre 4,2 e 4,8), pode crescer em pH menor do que 3,9 e depende da presença de suco de tomate para o crescimento. Os leuconostocs

não crescem nessas condições de acidez e não exigem o fator de crescimento presente no suco de tomate (um glico-derivativo do ácido pantotênico). *Oenococcus* também é resistente ao álcool e cresce em meios contendo 10% de etanol.

Métodos de análise

As orientações abaixo são da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001) e na 17ª Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004).

A contagem de bactérias lácticas apresentada nesse capítulo objetiva quantificar todas as bactérias do grupo, sem diferenciação entre os gêneros. Os meios de cultura utilizados são especialmente formulados para garantir o crescimento das espécies mais exigentes. A incubação normalmente é feita em condições microaerófilas, para recuperar as espécies mais sensíveis ao oxigênio.

Para a contagem total de bactérias lácticas em produtos lácteos, fermentados ou não, o Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004) recomenda, o plaqueamento em profundidade, utilizando o Ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS) ou o Ágar Elliker como meios de cultivo. A incubação a 32°C/48h é indicada para a contagem de mesófilos e a 37°C/48h para a contagem de termodúricos. Para garantir condições microaerófilas pode ser usada sobrecamada do mesmo meio ou jarros com atmosfera microaerófila.

Para a contagem em outros produtos, há recomendações em vários capítulos do *Compendium*, incluindo o Capítulo 19 (Hall *et al.*, 2001), o Capítulo 47 (Richter & Vedamuthu, 2001), o Capítulo 53 (Smittle & Cirigliano, 2001), o Capítulo 58 (Hatcher *et al.*, 2001) e o Capítulo 63 (Murano & Hudnall, 2001).

Dois métodos podem ser usados, o plaqueamento em profundidade ou a técnica do Número Mais Provável (NMP), com uma série de opções de meios de cultura. Esses meios, suas principais aplicações, método de utilização e condições de incubação encontram-se sumariados no Quadro 14.2 e descritas abaixo.

a) Ágar/Caldo MRS. O MRS (de Man Rogosa & Sharpe) é um meio desenvolvido para favorecer o crescimento de vários lactobacilos, particularmente os do leite. Permite também um crescimento luxurioso de *Leuconostoc* e *Pediococcus* (Richter & Vedamuthu, 2001). O caldo é recomendado para a contagem de bactérias lácticas heterofermentativas pelo método do NMP, em diferentes produtos (Hall *et al.*, 2001). O ágar é um dos meios mais usados para a contagem em placas, podendo ser acidificado e/ou suplementado com vários componentes, para conferir uma certa seletividade e/ou especificidade.

a.1) Ágar MRS 0,5% Frutose. A adição de 0,5% de frutose ao MRS, incubado a 20-28°C, favorece o crescimento de *Lactobaccilus fructivorans* e *Lactobacillus brevis* deteriorantes de maionese e outros molhos para saladas. A suplementação é feita adicionando-se 5ml de uma solução aquosa 10% de frutose (esterilizada por filtração) a 100ml do ágar MRS estéril, fundido e resfriado (Smittle & Cirigliano, 2001).

a.2) Ágar MRS Acidificado. A acidificação do MRS é feita para inibir bactérias esporogênicas. Usado no plaqueamento em profundidade, tem-se mostrado útil na enumeração de bactérias lácticas deteriorantes totais em produtos vegetais. A acidificação é feita adicionado-se ácido acético glacial estéril ao ágar MRS já esterilizado, fundido e resfriado, até que o pH chegue a 5,4±0,2 (Hall *et al.*, 2001, Murano & Hudnall, 2001).

Quadro 14.2. Meios de cultura para contagem de bactérias lácticas em alimentos, suas principais aplicações e forma de utilização.

Meio[a]	Aplicação	Método[b]	Condição de incubação
Ágar MRS ou Ágar Elliker	Contagem total de bactérias lácticas em produtos lácteos	Plaqueamento em profundidade e sobrecamada do mesmo meio	32±1ºC/48±3h (favorece mesófilos) ou 37±1ºC/48±3h (favorece termodúricos) atmosfera normal
Ágar MRS	Contagem total de bactérias lácticas em alimentos diversos	Plaqueamento em profundidade e sobrecamada do mesmo meio	30±1ºC/48±3h atmosfera normal
Ágar MRS 0,5% Frutose	Favorecer *Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus brevis* deteriorantes em maionese e molhos para saladas	Plaqueamento em profundidade e sobrecamada do mesmo meio	20-28ºC/até 14 dias atmosfera normal
Ágar MRS Acidificado	Contagem total de bactérias lácticas em produtos vegetais	Plaqueamento em profundidade	35±1ºC/72±3h anaerobiose
Ágar MRS Acidificado 1% Frutose	Favorecer *Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus plantarum* deteriorantes em produtos vegetais	Plaqueamento em profundidade e sobrecamada do mesmo meio	30±1ºC/5 dias atmosfera normal
Ágar MRS 0,1% Ácido Sórbico	Contagem de lácticas deteriorantes em produtos cárneos fermentados, inibindo leveduras	Plaqueamento em profundidade	20±1ºC/5 dias anaerobiose
Ágar MRS 0,1% Cisteína 0,02% Ácido Sórbico	Contagem de lácticas deteriorantes em produtos cárneos fermentados, inibindo leveduras e bactérias Gram negativas	Plaqueamento em profundidade	20±1ºC/5 dias anaerobiose
Ágar MRS com sobrecamada de APT acidificado	Contagem de lácticas deteriorantes em molhos para saladas	Plaqueamento em profundidade e sobrecamada de APT acidificado	35±1ºC/96±4h atmosfera normal
Ágar APT	Enumerar lacticas heterofermentativas em produtos cárneos curados e propagar pediococos	Plaqueamento em profundidade e sobrecamada do mesmo meio	25±1ºC/72±3h atmosfera normal
Ágar APT Sacarose BCP	Enumerar lácticas deteriorantes de produtos cárneos, deferenciando de outros bactérias presentes	Plaqueamento em profundidade e sobrecamada do mesmo meio	25±1ºC/48-72h atmosfera normal
Ágar APT Glicose	Enumerar lácticas deteriorantes de frutos do mar	Plaqueamento em profundidade	20±1ºC/72±3h anaerobiose
OSA	Enumerar microrganismos deteriorantes (não só lacticas) de suco de laranja concentrado congelado e outros produtos derivados de laranja	Plaqueamento em profundidade e sobrecamada do mesmo meio	30±1ºC/48±3h atmosfera normal
Caldo MRS	Contagem de bactérias lácticas heterofermentativas	Técnica do NMP	35±1ºC/4 dias atmosfera normal
Caldo Rogosa SL[c] e Ágar MRS Modificado	Contagem de bactérias lácticas em matéria vegetal	Técnica do NMP	Rogosa 45±1ºC/3 a 5 dias atmosfera normal MRS Modificado 30±1ºC/72±3h anaerobiose

[a] MRS = de Man Rogosa & Sharpe, APT = All Purpose Tween, BCP = Púrpura de bromocresol, OSA = Agar Soro de Laranja

[b] Em todos os métodos descritos, as culturas isoladas devem ser confirmadas por coloração de Gram (+), forma das células (cocos, bastonetes ou cocobacilos) e teste de catalase (-).

[c] Nesse procedimento o Caldo Rogosa SL pode ser substituído por leite em pó reconstituído a 10%, suplementado com 0,05% de glicose e incubado a 30±1ºC/3-5 dias.

a.3) Ágar MRS Acidificado 1% Frutose. A adição de 1% de frutose ao MRS acidificado, incubado a 30ºC, favorece o crescimento de *Lactobaccilus fructivorans* e *Lactobacillus plantarum* deteriorantes de produtos vegetais. Preparar o meio adicionando 10ml de uma solução aquosa 10% de frutose (esterilizada por filtração) a 100ml do ágar MRS (estéril, fundido e resfriado) e ácido acético glacial estéril até que o pH chegue a 5,4±0,2 (Hall *et al.*, 2001).

a.4) Ágar MRS 0,1% Ácido Sórbico. A adição de 0,1% de ácido sórbico ao MRS é feita para inibir leveduras. É particularmente útil para a contagem de bactérias lácticas deteriorantes em produtos cárneos fermentados. Para a preparação do meio, ajustar o pH do MRS (estéril, fundido e resfriado) em 5,7±0,1, com ácido clorídrico 5N. Adicionar então o ácido sórbico (dissolvido em NaOH), na quantidade necessária para concentração final 0,1% (Hall *et al.*, 2001, Murano & Hudnall, 2001).

a.5) Ágar MRS 0,1% Cisteína 0,02% Ácido Sórbico. Essa modificação objetiva inibir leveduras e bactérias Gram negativas, na contagem de bactérias lácticas deteriorantes em produtos cárneos fermentados. Para a preparação do meio, suplementar o MRS com 0,1% de cloridrato de cisteína (cisteína-HCl) e esterilizar. Ajustar o pH do meio estéril, fundido e resfriado em 5,7±0,1, com ácido clorídrico. Adicionar então o ácido sórbico (dissolvido em NaOH), na quantidade necessária para concentração final 0,02% (Hall *et al.*, 2001, Murano & Hudnall, 2001).

a.6) Ágar MRS com sobrecamada de Ágar APT Acidificado. Essa combinação de meios é particularmente útil para a a quantificação de bactérias lácticas deteriorantes de molhos para saladas. O plaqueamento em profundidade permite uma certa recuperação do "stress" no Ágar MRS, antes da adição da sobrecamada. Depois de adicionada, a sobrecamada de APT acidificado elimina a interferência de bactérias esporogênicas, frequentemente presentes nesses produtos. O Ágar APT acidificado é preparado adicionando-se ácido tartárico (solução aquosa a 10%, esterilizada a 121ºC/15min) ao Ágar APT estéril, fundido e resfriado, até que o pH chegue a 4,0±0,1 (Hall *et al.*, 2001).

b) Ágar APT (All Purpose Tween). Originalmente desenvolvido para a contagem de bactérias lácticas em produtos cárneos curados, é também utilizado para a propagação de *Pediococcus.* Pode ser suplementado com sacarose ou glicose, para conferir uma certa especificidade ao meio.

b.1) Ágar APT BCP 2% Sacarose. A adição de 2% de sacarose ao APT com 0,032g/l de BCP (púrpura de bromocresol) é utilizada para enumerar bactérias lácticas deteriorantes de produtos cárneos, diferenciando de outras bactérias. Preparar o meio adicionando 20g de sacarose e 0,032g de BCP a um litro de APT, antes da esterilização (Hall *et al.*, 2001).

b.2) Ágar APT 1,5% Glicose. A adição de mais 5g/l de glicose ao APT, que já contém 10g/l, é utilizada para enumerar bactérias lácticas deteriorantes de pescados e frutos do mar. Preparar o meio adicionando 5g de glicose a um litro de APT, antes da esterilização (Hall *et al.*, 2001).

c) Ágar Soro de Laranja (OSA). Meio de enriquecimento desenvolvido especificamente para o cultivo e enumeração de microrganismos associados com a deterioração de produtos derivados de frutas cítricas, permite ótimo crescimento de *Lactobacillus* e outros microrganismos acidúricos. É particu-

larmente indicado para a contagem total de microrganismos aeróbios em suco de laranja concentrado congelado e outros produtos derivados de laranja, incubação a 30°C/48h (Hatcher *et al.*, 2001).

d) Ágar/Caldo Rogosa SL/Ágar MRS Modificado. Rogosa SL é um meio com características seletivas (pH 5,4 e alta concentração de acetato), desenvolvido para o cultivo de *Lactobacillus* de origem oral e fecal. Suplementado com 0,04% de cicloeximida é indicado para a contagem de bactérias lácticas deteriorantes de matéria vegetal, pela técnica do NMP. Para o plaqueamento é utilizado o Ágar MRS Modificado, preparado adicionando-se 0,01% de TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólium) ao Ágar MRS. Nesse procedimento o Caldo Rogosa pode ser substituído por leite em pó reconstituído a 10%, suplementado com 0,05% de glicose e esterilizado a 108°C/10min (Hall *et al.*, 2001).

14.2. MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACAS

Metodologia da American Public Health Association (APHA), descrita no Capítulo 19 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Hall *et al.*, 2001) e no Capítulo 8 da 17º Edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

Atenção. Recomenda-se que amostras destinadas à enumeração de bactérias lácticas não sejam congeladas, em função da alta sensibilidade desses microrganismos às injúrias pelo congelamento. Se o produto é normalmente congelado, não deve ser descongelado e recongelado antes das análises.

14.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op) e tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem em placas

- Meio(s) de cultura: selecionar de acordo com as orientações do Quadro 14.2
- Sistema de geração de atmosfera anaeróbia ou microaerófila (se recomendado no Quadro 14.2)
- Estufa incubadora regulada na temperatura recomendada no Quadro 14.2, com termômetro calibrado

Confirmação

- Reagentes para coloração de Gram
- Reagente para teste de catalase

2.2. PROCEDIMENTO

O procedimento de análise de bactérias lácticas pelo método de contagem em placas encontra-se descrito na Figura 14.1.

a) Preparação da amostra e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2. Entretanto, não deve ser utilizado Tampão Fosfato na preparação das amostras, porque pode causar injúrias às células. O diluente recomendado é a Água Peptonada 0,1%.

> **Nota a.1)** Na homogeneização de amostras para contagem de fermentos lácteos em produtos fermentados, pode ser vantajoso utilizar liquidificador, para romper cadeias de bactérias lácticas. Isso é particularmente útil para produtos recentemente fabricados, podendo resultar em contagens mais acuradas das bactérias presentes. O copo do liquidificador e o diluente devem ser resfriados antes da homogeneização.

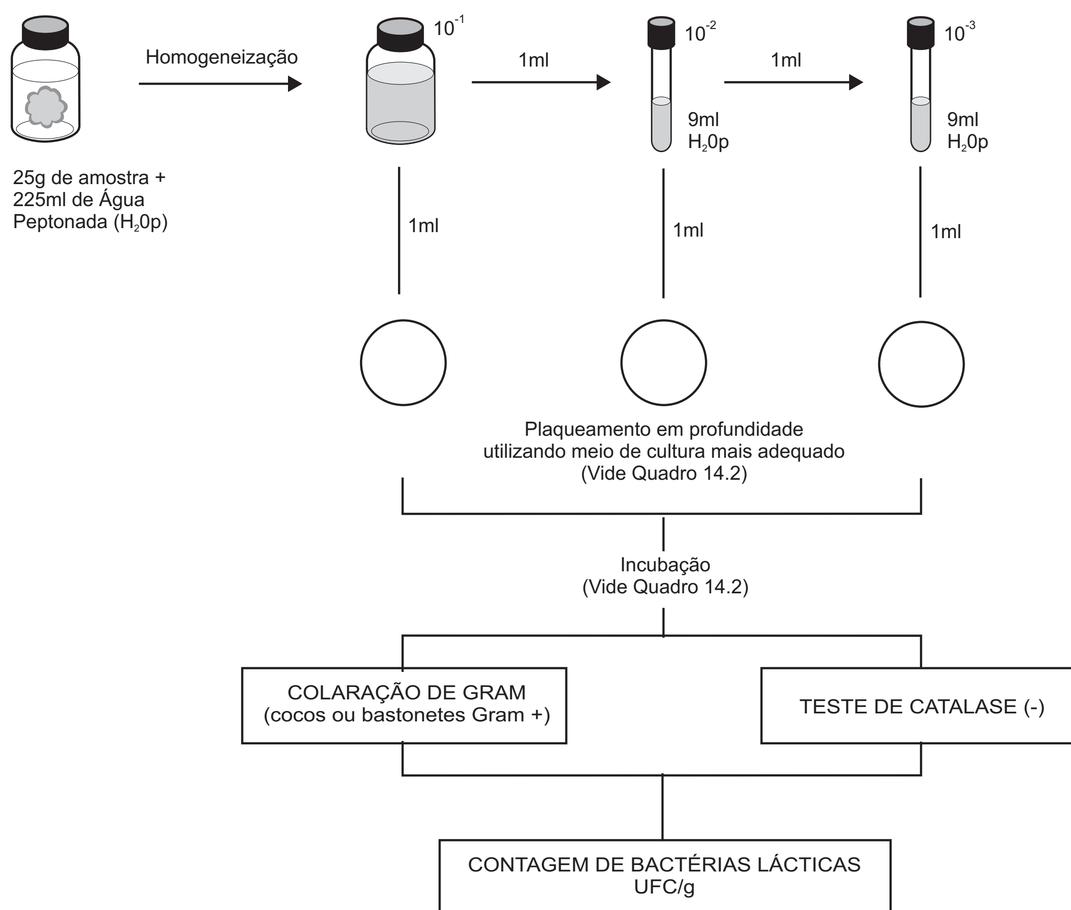


Figura 14.1. Esquema de análise de bactérias lácticas pelo método de contagem em placas (Hall *et al.*, 2001, Frank & Yousef, 2004).

b) Inoculação. Selecionar três diluições adequadas e inocular 1ml de cada diluição em placas de Petri estéreis vazias, adicionando, em seguida, o meio de cultura mais adequado à amostra analisada. Para a seleção do meio, seguir a orientação do Quadro 14.2. Nas situações em que seja recomendada a utilização de sobrecamada, aguardar a completa solidificação do ágar e adicionar um pequena quantidade do meio recomendado para a sobrecamada, cobrindo totalmente a superfície do meio inoculado.

c) Incubação. Incubar as placas invertidas, nas condições estabelecidas no Quadro 14.2. Placas com sobrecamada podem ser incubadas em atmosfera normal. Placas sem sobrecamada devem ser acondi-

cionadas em jarro com atmosfera anaeróbia ou microaerófila, conforme a recomendação do Quadro 14.2. Para obtenção da atmosfera anaeróbia, podem ser utilizados sistemas geradores de anaerobiose disponíveis comercialmente, como o BD Biosciences GasPak® Anaerobic Systems, o Anaerogen Oxoid, o Anaerocult A Merck e o Anaerobac Probac do Brasil. Para a geração da atmosfera microaerófila também podem ser utilizados sistemas disponíveis comercialmente, como o Anaerocult C Merck e o Microaerobac Probac do Brasil. Uma outra forma de obter a atmosfera microaerófila é acender uma vela no jarro, imediatamente antes de fechar. Depois que a vela apagar, a atmosfera obtida é adequada para o crescimento das bactérias lácticas (Richter & Vedamuthu, 2001).

d) Confirmação das colônias e cálculo dos resultados. Selecionar para a contagem as placas com 25 a 250 colônias e contar todas. Selecionar pelo menos cinco colônias presentes nas placas e submeter à coloração de Gram e teste de catalase. As culturas Gram positivas (cocos ou bastonetes) catalase negativas são consideradas confirmadas como bactérias lácticas. Calcular o número de UFC/g ou ml em função do número de colônias confirmadas e diluição inoculada. **Exemplo.** Plaqueamento em profundidade, diluição 10^{-2}, 25 colônias presentes, cinco submetidas à confirmação, quatro confirmadas (80%). UFC/g ou ml = $25x10^2 x0,8 = 2,0x10^3$.

14.3. MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Metodologia da American Public Health Association (APHA), descrita no Capítulo 19 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Hall *et al.*, 2001).

Há dois procedimentos recomendados, um utilizando o Caldo MRS, para bactérias lácticas heterofermentativas, e outro utilizando o Caldo Rogosa SL, para bactérias lácticas totais. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

Atenção: Amostras destinadas à enumeração de bactérias lácticas não devem ser congeladas, em função da alta sensibilidade desses microrganismos às injúrias pelo congelamento. Se o produto é normalmente congelado, não deve ser descongelado e recongelado antes das análises.

14.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada 0,1% (H_2Op)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada 0,1% (H_2Op)
- Pipetas de 1 ou 2ml

Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem utilizando o Caldo MRS

- Caldo MRS
- Estufa incubadora regulada a 35±1ºC com termômetro calibrado

Contagem utilizando o Caldo Rogosa SL

- Caldo Rogosa SL

- Ágar MRS Modificado
- Sistema de geração de atmosfera anaeróbia
- Estufa incubadora regulada 45±1°C com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada 30±1°C com termômetro calibrado

Confirmação

- Corantes para coloração de Gram
- Reagente para teste de catalase

14.3.2. PROCEDIMENTO UTILIZANDO O CALDO MRS

O procedimento de análise de bactérias lácticas heterofermentativas pelo método do NMP utilizando o Caldo MRS encontra-se descrito na Figura 14.2.

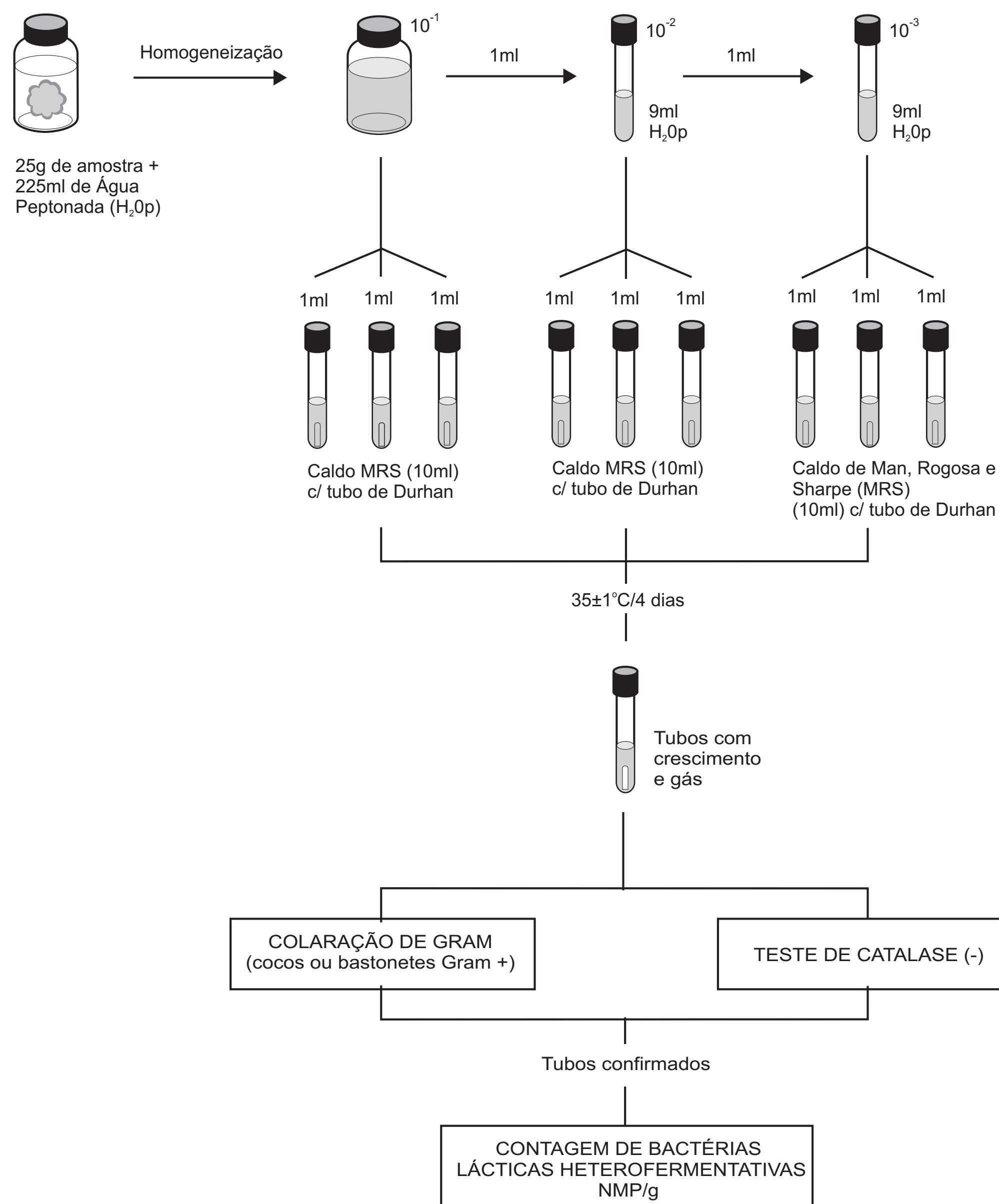


Figura 14.2. Esquema de análise de bactérias lácticas heterofermentativas pelo método do NMP utilizando o Caldo MRS (Hall *et al.*, 2001).

a) Preparação da amostra e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2. Entretanto, não deve ser utilizado Tampão Fosfato na preparação das amostras, porque pode causar injúrias às células. O diluente recomendado é a Água Peptonada 0,1%.

b) Inoculação e incubação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular uma série de três tubos de Caldo MRS por diluição, adicionando 1ml da diluição por tubo com 10ml de MRS com tubos de Durhan. Incubar os tubos a 35±1ºC/4 dias.

c) Confirmação. Verificar os tubos com crescimento e produção de gás, indicativos de bactérias lácticas heterofermentativas, e submeter à coloração de Gram e teste de catalase. As culturas Gram positivas (cocos ou bastonetes) catalase negativas são consideradas confirmadas.

d) Cálculo dos resultados. Anotar o número de tubos confirmados e determinar o NMP/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

14.3.3. PROCEDIMENTO UTILIZANDO O CALDO ROGOSA SL

O procedimento de análise de bactérias lácticas pelo método do NMP utilizando o Caldo Rogosa SL encontra-se descrito na Figura 14.3.

a) Preparação da amostra e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2. Entretanto, não deve ser utilizado Tampão Fosfato na preparação das amostras, porque pode causar injúrias às células. O diluente recomendado é a Água Peptonada 0,1%.

b) Inoculação e incubação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular uma série de três tubos de Caldo Rogosa SL por diluição, adicionando 1ml da diluição por tubo com 10ml de Rogosa. Incubar os tubos por três a cinco dias a 45±1ºC. O Caldo Rogosa SL pode ser substituído por leite em pó reconstituído a 10%, suplementado com 0,05% de glicose. Nesse caso os tubos devem ser incubados por três a cinco dias a 30±1ºC.

c) Plaqueamento. De cada tubo com crescimento, estriar (estrias de esgotamento) uma alçada da cultura em placas de Ágar MRS Modificado e incubar as placas a 30±1ºC/72±3h.

d) Confirmação. Selecionar duas colônias isoladas de cada placa e submeter à coloração de Gram e teste de catalase. As culturas Gram positivas (cocos ou bastonetes) catalase negativas são consideradas confirmadas como bactérias lácticas.

e) Cálculo dos resultados. Anotar o número de tubos confirmados e determinar o NMP/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

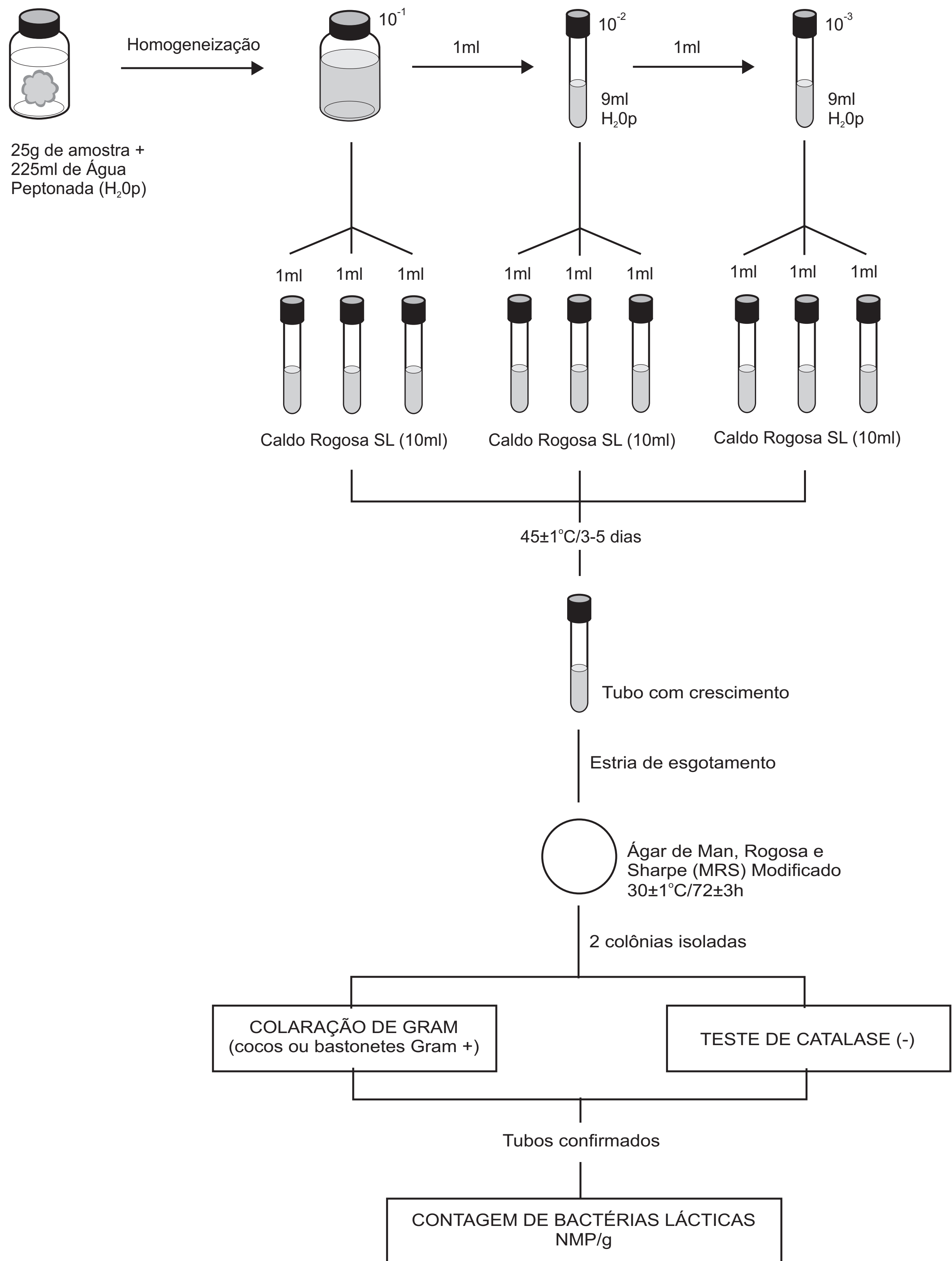


Figura 14.3. Esquema de análise de bactérias lácticas pelo método do NMP utilizando o Caldo Rogosa SL (Hall *et al.*, 2001).

14.4. REFERÊNCIAS

BJÖRKROTH, J. & HOLZAPFEL, W., 2003. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: DWORKIN, M. *et al.* (eds.), **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.12, 28/03/2003, Springer-Verlag, New York. Disponível no site<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>, acesso em 04/05/2006.

DEVRIESE, L., BAELE, M., BUTAYE, P. The Genus *Enterococcus*. In: DWORKIN, M. *et al.* (eds.), **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.2, 25/07/2000, Springer-Verlag, New York. http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm, acesso em 04/05/2006.

DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D.C., 2001.

DSMZ, 2006. **Bacterial nomenclature up-to-date**. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. URL: <http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14>. Acesso em 10/10/06.

EUZÉBY, J.P., 2003. *Carnobacterium*. In: **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire Online**. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/carnobacterium.html>, acesso em 20/04/2006.

EUZÉBY, J.P., 2004a. *Vagococcus*. In: **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire Online**. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/vv/vagococcus.html>, acesso em 20/04/2006.

EUZÉBY, J.P., 2004b. *Weissella*. In: **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire Online**. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ww/weissella.html>, acesso em 20/04/2006.

EUZÉBY J.P., 2006a. **List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature**: a Folder Available on the Internet. Last full update February 2006, <http://www.bacterio.net>.

EUZÉBY J.P., 2006b. Quelques caractères bactériologiques des coques à Gram positif et catalase négative. In: **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire Online**. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/tstreptococcaceae.html>, acesso em 20/04/2006.

FRANK, J.F., YOUSEF, A.E. Tests for groups of microrganisms. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F., **Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed**. American Public Health Association, Washington, D.C., 2004. Chapter 8, p.227-247, Section 8.071.

HALL, P.A., LEDENBACH, L., FLOWERS, R.S. Acid-producing microorganisms. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 19, p. 201-207.

HAMMES, W.P. & HERTEL, C., 2003. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M. *et al.* (eds.), **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.15, 15/12/2003, Springer-Verlag, New York. Disponível em <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>, acesso em 04/05/2006.

HATCHER, W.S., PARISH JR., M.E., WEIHE, J.L. *et al.* Fruit beverages. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 58, p.565-568, Section 58.51.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ª Ed.** Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

HOLZAPFEL, W.H., FRANZ, C.M.A.P.,LUDWIG, W. *et al.*, 2005. The Genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In: DWORKIN, M. *et al.* (eds.), **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.20, 31/12/2005, Springer-Verlag, New York. Disponível no site<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>, acesso em 04/05/2006.

LAFARGE, V., OGIER, J.C., GIRARD, V. *et al.*, 2004. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. **Applied and Environmental Microbiology 70(9)**: 5644-5650.

MURANO, E.A. & HUDNALL, J.A. Media, reagents, and stains. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 63, p.601-657.

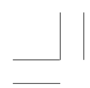
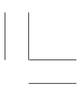
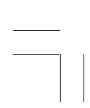
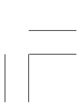
RICHTER, R.L. & VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 47, p.483-495.

SMITLLE, R.B. & CIRIGLIANO, M.C. Salad dressings. In: DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 53, p.541-544.

SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1st Ed. Vol. II**. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.

TEUBER, M. & GEIS, A., 2002. The Genus *Lactococcus*. In: DWORKIN, M. *et al.* (eds.), **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.10, 27/09/2002, Springer-Verlag, New York. Disponível no site<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>, acesso em 04/05/2006.

WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed.** American Public Health Association, Washington, D.C., 2004.

Capítulo 15

Campylobacter

15.1. INTRODUÇÃO

Campylobacter é uma das principais causas de diarréia em humanos, sendo C*ampylobacter jejuni* subsp. *jejuni* e C*ampylobacter coli* as espécies mais freqüentemente associadas com gastrenterites agudas veiculadas por alimentos. *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis* também são reconhecidos como patógenos primários, mas não isolados com tanta frequência (WHO, 2000). Nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido, *C. jejuni* subsp. *jejuni* tem respondido por mais de 90% das cepas isoladas de casos clínicos (Tauxe *et al.*, 1988, PHAC, 2003, Stanley & Jones, 2003, Gupta *et al.*, 2004).

As doenças de origem alimentar (DTAs) provocadas por *C. jejuni* subsp. *jejuni* incluem gastroenterite, septicemia, meningite, aborto e síndrome de Guillain-Barré (SGB). A SGB é classificada pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) no grupo de risco IB, que inclui as doenças "de severo perigo para população restrita, representando ameaça de morte, seqüelas crônicas ou longa duração".

Taxonomia

As informações abaixo são da 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vandamme *et al.*, 2005) e do *Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire Online* (Euzéby, 2004).

As principais características das espécies de *Campylobacter* encontram-se sumariadas no Quadro 15.1.

Campylobacter faz parte da família *Campylobacteriaceae* e inclui espécies de bactérias Gram negativas, não esporogênicas, na forma de bastonetes curvos espiralados, com uma ou mais espirais. Apresentam arranjo típico em forma de "S" ou "asa de gaivota", quando duas células formam pequenas cadeias. São móveis (exceto *C. gracilis*), apresentando motilidade característica em movimentos tipo saca-rolha ou vaivém.

Microaerófilos, requerem baixas concentrações de oxigênio (3-15%) e altas concentrações de CO_2 (3-5%) para o crescimento. O sangue ou o soro estimulam o crescimento, mas não são indispensáveis. O metabolismo energético é oxidativo e são oxidase positivos, exceto *C. gracilis* e algumas cepas de *C. concisus* e *C. showae*. Não utilizam carboidratos como fonte de energia, sempre derivada da oxidação de aminoácidos ou de ácidos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico.

São inativos na maior parte dos testes bioquímicos convencionais, não produzindo ácidos ou compostos neutros de metabolismo. Não hidrolisam gelatina, caseína, amido ou tirosina. Vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) negativos. Algumas espécies apresentam atividade de arilsulfatase mas não de lecitinase ou lipase. A maioria reduz o nitrato.

Crescem a 35-37ºC, não crescem a 4ºC e a maioria também não cresce a 25ºC. A temperatura ótima varia entre as espécies, na faixa de 30 a 42ºC.

Campylobacters termotolerantes. As espécies de *Campylobacter* associadas com doenças transmitidas por alimentos (*C. jejuni*, *C.coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*) constituem um grupo distinto no gênero *Campylobacter*, chamado de termotolerantes. Caracteristicamente, essas espécies apresentam temperatura ótima de crescimento na faixa dos 42-43°C (Pearson & Healing, 1992) e não crescem abaixo dos 30°C (Stanley & Jones, 2003).

A faixa de temperatura de crescimento de *C. jejuni* subsp. *jejuni* vai de 32 a 45°C e não cresce a 47°C. Não é termorresistente, sendo facilmente destruído pela pasteurização, com valor D_{55} entre 0,6 e 2,3min. O pH ótimo é de 6,5 a 7,5, o pH máximo é de 9,0 a 9,5, não cresce em pH 4,7 e morre rapidamente em pH 4,0. É bastante sensível à secagem, não crescendo em presença de 2% de NaCl (atividade de água de aproximadamente 0,971) (ICMSF, 1996).

Quadro 15.1. Características bioquímicas e de crescimento das espécies e subspécies de *Campylobacter* (Vandamme *et al.*, 2005)[a].

Espécie	Oxidase	Catalase	Urease	H_2S TSI	Indoxil acetato	Hipurato	Nitrato	Crescimento				
								25°C	42°C	2% bile	2% NaCl	1% glicina
C. fetus subsp. fetus	+	+	-	-	-	-	+	+	M	+	-	+
C. fetus subsp. venerealis	+	M	-	-	-	-	M	M	-	M	-	-
C. coli	+	+	-	F[b]	+	-	+	-	+	M	-	+
C. concisus	M	-	-	-[b]	-	-	F	-	M	F	F	F
C. curvus	+	-	-	F	M	F	+	-	M	-	F	+
C. gracilis	-	F	-	-	M	-	M	-	M	-	F	+
C. helveticus	+	-	-	-	+	-	+	-	+	F	-	F
C. hominis	+	-	-	-	-	-	-	-	F	F	M	+
C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis	+	+	-	M[b]	-	-	+	-	+	+	-	+
C. hyointestinalis subsp. lawsonii	+	+	-	M[c]	-	-	+	-	+	-	-	F
C. jejuni subsp. jejuni	+	+	-	-	+	+	+	-	+	M	-	M
C. jejuni subsp. doylei	+	M	-	-	+	+	-	-	-	-	-	F
C. lanienae	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
C. lari	+	+	V	-	-	-	+	-	+	+	M	+
C. mucosalis	+	-	-	+[c]	-	-	-	-	+	M	M	F
C. rectus	+	F	-	-	+	-	+	-	F	-	M	+
C. showae	F	+	-	F	-	-	+	-	F	-	+	F
C. sputorum	+	V	V	+[c]	-	-	+	-	+	I	+	+
C. upsaliensis	+	-	-	-	+	-	+	-	M	+	-	+

[a] Símbolos: + = 95-100% das cepas positivas, - = 0-11% das cepas positivas, V = variável, F = 14-50% das cepas positivas, M = 60-93% das cepas positivas. Todos os dados são baseados em reações obtidas usando os procedimentos padronizados de On & Holmes (1991, 1992, 1995).
[b] Traços
[c] Abundante

Patogenicidade

As informações abaixo são do *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos* do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo (Informe-Net DTA, 2003) e do *Fact Sheet Nº 255* da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000).

Campylobacter é isolado de diversas fontes e pode provocar uma série de doenças em humanos, apresentadas no Quadro 15.2.

A doença causada pelo *C. jejuni* subsp. *jejuni* é chamada de campilobacteriose, enterite por *Campylobacter* ou gastroenterite. A dose infectiva é baixa, estimando-se que a ingestão 400-500 células possa provocar a doença. O período de incubação é de dois a cinco dias, a duração, em geral, é de sete a dez dias e reincidências não são incomuns (25% dos casos). O principal sintoma é diarréia líquida ou com muco, contendo sangue (geralmente oculto) e leucócitos fecais. Outros sintomas são febre, dor abdominal, náusea, dor de cabeça e dores musculares. A maior parte das infecções é auto-limitada e não necessita tratamento com antibióticos. Complicações não são comuns, embora essas infecções possam estar relacionadas à artrite reativa, síndrome hemolítico-urêmica (HUS), septicemia e infecções em outros órgãos. A taxa de letalidade é de 0,1 óbitos por mil casos. Fatalidades são raras em indivíduos saudáveis, mas costumam ocorrer em pacientes com câncer ou outras doenças debilitantes. Há registros de casos de aborto séptico por *C. jejuni* na literatura. Meningite, colite recorrente, colecistite aguda e Síndrome de Guillain-Barré (SGB) são complicações mais raras. Estima-se que um caso em cada mil infecções diagnosticadas evoluem para SGB, uma paralisia que dura várias semanas e requer cuidados intensivos.

Quadro 15.2. Fontes de isolamento das espécies de *Campylobacter* e doenças provocadas em humanos (Euzéby, 2004).

Espécie	Fontes de isolamento	Doenças provocadas em humanos
C. coli	Suínos, bovinos, ovinos, aves	Gastroenterite, septicemia, aborto
C. concisus	Humanos	Periodontite, gastroenterite
C. curvus	Humanos	Gastroenterite, periodontite
C. fetus subsp. fetus	Bovinos, ovinos	Septicemia, gastroenterite, aborto, meningite
C. fetus subsp. venerealis	Bovinos	Septicemia
C. gracilis	Humanos	Periodontite, empiema, abcessos
C. helveticus	Cães e gatos	Não relatado
C. hominis	Humanos	Não patogênico, comensal no intestino
C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis	Suínos, bovinos, hamsters, gamos, humanos	Gastroenterite
C. hyointestinalis subsp. lawsonii	Suínos (estômago)	Não relatado
C. insulaenigrae	Mamíferos marinhos	Não relatado
C. jejuni subsp. doylei	Humanos	Gastroenterite, gastrite, septicemia
C. jejuni subsp. jejuni	Aves, suínos, ruminantes, cães, gatos, visons, coelhos, insetos, água	Gastroenterite, septicemia, meningite, aborto, síndrome de Guillain-Barré (SGB)
C. lanienae	Humanos	Não relatado
C. lari	Aves, cães, gatos, macacos, cavalos, lobos marinhos, água doce e salgada	Gastroenterite, septicemia
C. mucosalis	Suínos	Não relatado
C. rectus	Humanos	Periodontite
C. showae	Humanos	Periodontite
C. sputorum	Ovinos, bovinos, suínos, humanos	Gastroenterite, enterite, abcessos
C. upsaliensis	Cães, gatos, humanos	Gastroenterite, septicemia, abcessos, aborto

As cepas de *Campylobacter* são amplamente distribuídas em animais de sangue quente, domésticos ou silvestres. São prevalentes em frangos, bovinos, suínos, ovinos e em animais de estimação, incluindo cães e gatos. A principal rota de transmissão é o consumo de alimentos contaminados, principalmente carne mal cozida, produtos cárneos e leite cru. Água contaminada não tratada também é uma fonte reconhecida de infecção. A campilobacteriose é considerada uma zoonose, isto é, uma doença transmitida dos animais ou produtos animais para o homem. Nos animais *Campylobacter* raramente provoca doenças. Em humanos, pode atingir indivíduos de qualquer idade, mas crianças menores de cinco anos e adultos entre 15 e 29 anos são mais afetados.

Métodos de análise

Os métodos da International Organization for Standardization (ISO 10272-1 e 2, 2006), da Food and Drug Administration (Hunt *et al.*, 2001) e do Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture (Ransom & Rose, 1998) são direcionados às espécies termotolerantes de *Campylobacter*, com temperatura de incubação de 41,5 ou 42°C. As principais etapas de cada um desses procedimentos estão descritas no Quadro 15.3. São muito semelhantes, incluindo uma etapa de pré enriquecimento em caldo seletivo incubado a 37°C, uma etapa de enriquecimento no mesmo caldo, mas com temperatura de incubação elevada para 41,5 ou 42°C, uma etapa de plaqueamento em um ou dois meios seletivos diferenciais, incubados a 41,5 ou 42°C e uma seleção inicial das culturas para confirmação, baseada nas características típicas de forma, arranjo e motilidade de *Campylobacter*.

Todos esses métodos fazem menção à necessidade de cuidados no transporte e estocagem das amostras. A ISO 10272-1 (2006) destaca a sensibilidade de *Campylobacter* ao congelamento e à secagem, recomendando que as amostras não sejam congeladas e que sejam protegidas contra a perda de umidade. Indica estocagem à 3 ± 2°C e análise o mais rápido possível. O BAM/FDA e o MLG/FSIS/USDA apresentam maiores detalhes e considerações:

O MLG/FSIS/USDA destaca que *Campylobacter* é sensível ao congelamento e morre à temperatura ambiente. Durante a estocagem refrigerada (indica 4°C) pode ser sobrepujado pela microbiota psicrotrófica acompanhante nas amostras, que devem ser analisadas o mais rápido possível. Se o congelamento for inevitável, devem ser usados agentes criopotetores (glicerol ou dimetil sulfóxido na concentração de 10% em relação à quantidade de amostra). Para a estocagem congelada de "swabs", indica Caldo Brucella suplementado com 10% de polivinil pirrolidina.

O BAM/FDA destaca que *Campylobacter* é sensível ao ar, secagem, baixo pH, aquecimento, congelamento e estocagem prolongada, podendo sofrer injúrias que dificultam a detecção. Células velhas ou estressadas gradualmente adquirem forma cocoide e se tornam mais difíceis de cultivar. Para estocagem prolongada, *C. jejuni* subsp *jejuni* pode sobreviver duas a quatro semanas sob refrigeração (4°C), se for garantida baixa tensão de oxigênio e proteção contra perda de umidade (exceto no caso de leite cru). Nas mesmas condições, também pode sobreviver dois a cinco meses a 20°C negativos. Outras espécies, nas mesmas condições, podem sobreviver (mas não se multiplicar) uma a três semanas a 4°C (exceto no caso de leite cru). A população diminui dois ciclos logarítmicos a 20°C negativos, mas os sobreviventes podem ser recuperados após mais de cinco meses. Uma vez abertos os frascos ou embalagens, a análise deve ser feita o mais rápido possível, porque a introdução de oxigênio é particularmente deletéria para as células, já debilitadas pela estocagem prolongada.

Quadro 15.3. Meios e condições de incubação recomendados pela FDA, USDA e ISO nas diversas etapas da análise de *Campylobacter* em alimentos.

Método	Pré Enriquecimento[a]	Enriquecimento[a]	Plaqueamento[a]	Seleção das culturas para confirmação
BAM/FDA	BEB[b] 37±2ºC/4h ou 30±2ºC/3h + 37±2ºC/2h Agitação Atmosfera microaerófila	Transferir para 42±1ºC Manter por 23-24h com agitação ou 28-29h sem agitação[c] Atmosfera microaerófila	AHB e m-CCDA[e] 42±1ºC/24-48h Atmosfera microaerófila	Forma, arranjo e motilidade típicos
MLG/FSIS/USDA	HEB[d] 37±1ºC/4h Agitação Atmosfera microaerófila	Transferir para 42±1ºC[d] Manter por 20h Agitação Atmosfera microaerófila	m-CCDA[e] 42±1ºC/24-48h Atmosfera microaerófila	Forma, arranjo e motilidade típicos
ISO 10272-1:2006 Presença/ausência	BEB 37±1ºC/4-6h Atmosfera microaerófila	Transferir para 41,5±1ºC Manter por 44±4h Atmosfera microaerófila	m-CCDA[e] e 2º meio de escolha do laboratório[f] 41,5±1ºC/44±4h Atmosfera microaerófila	Forma, arranjo e motilidade típicos
ISO 10272-2:2006 Contagem em placas	Preparar a 1º diluição e as diluições subsequentes conforme orientação do Capítulo 2, passando diretamente ao pleaqueamento em superfície, sem pré enriquecimento ou enriquecimento		Plaqueamento em superfície m-CCDA[e] e 2º meio de escolha do laboratório[f] 41,5±1ºC/44±4h Atmosfera microaerófila	Forma, arranjo e motilidade típicos

BAM/FDA = *Bacteriological Analytical Manual Online* da Food and Drug Administration (Hunt *et al.*, 2001), **MLG/FSIS** = *Microbiological Laboratory Guidebook Online* do Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture (Ransom & Rose, 1998).

[a] **AHB** = Ágar Abeyta-Hunt-Bark, **BEB** = Caldo Bolton, **m-CCDA** = Ágar *Campylobacter* Charcoal Diferencial Modificado = Ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado, **HEB** = Caldo de Enriquecimento de Hunt,

[b] 37±2ºC/4h para amostras com menos de 10 dias de produção e produtos lácteos, 30±2ºC/3h seguidas de 37±2ºC/2h para amostras que tenham sido mantidas sob refrigeração por mais de 10 dias e amostras de moluscos e crustáceos.

[c] Moluscos e crustáceos 27-28h sob agitação ou 48h sem agitação, produtos lácteos 48h com ou sem agitação.

[d] Concentração de 15mg/l de cefoperazona no pré enriquecimento e 30mg/l no enriquecimento.

[e] A formulação do m-CCDA descrita pelo BAM/FDA, MLG/FSIS e ISO 10272-1 e 2 são ligeiramente diferentes (vide Capítulo de preparo de meios e reagente).

[f] Recomenda-se selecionar meios baseados em princípios diferentes do m-CCDA. O Ágar de Skirrow, o Ágar de Preston ou o Ágar Karmali podem ser utilizados.

Na realização do ensaio, a incubação é feita sob condições microaerófilas, sendo indicada pelo BAM/FDA e MLG/FSIS/USDA uma composição gasosa com 5% de O_2, 10% de CO_2 e 85% de N_2. A ISO 10272-1 (2006) e a ISO 10272-2 (2006) indicam 5±2% de O_2, 10±3% de CO_2, menos de 10% de H_2 (opcional) e a quantidade de N_2 necessária para completar 100%.

Para aumentar a tolerância ao oxigênio, os meios de cultivo contém diversas combinações dos seguintes agentes seqüestrantes: sulfato ferroso, metabissulfito de sódio, piruvato de sódio (a combinação desses três é chamada de FBP), charcoal, heme e sangue. Esses agentes previnem o acúmulo de foto-derivativos do oxigênio nos meios de cultura e neutralizam o peróxido de hidrogênio produzido durante o crescimento (particularmente o sangue, o charcoal e o piruvato de sódio) (Bolton *et al.*, 1984). O sangue também neutralisa inibidores da trimetroprima.

Para reduzir a competição da microbiota acompanhante, os meios contém diversas combinações dos seguintes antibióticos: cefoperazona de sódio, trimetroprima, vancomicina, rifampicina, anfotericina B e cicloeximida. A vancomicina inibe bactérias Gram positivas, a

trimetroprima inibe *Proteus*, a cefoperazona de sódio inibe bactérias Gram negativas entéricas e algumas Gram positivas, a anfotericina B e a cicloeximida inibem fungos.

O método de presença/ausência ISO 10272-1, descrito nesse capítulo, utiliza apenas quatro teste para a confirmação de *Campylobacter* termotolerantes em nível de gênero, a morfologia, arranjo e motilidade típicos (culturas atípicas podem ser descartadas), o teste de oxidase positivo, o crescimento negativo a 25ºC em condições microaerófilas e a incapacidade de crescer em condições aeróbias a 41,5ºC. A diferenciação das quatro espécies alvo do ensaio (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*) é opcional e utiliza cinco testes: catalase, sensibilidade ao ácido nalidíxico, sensibilidade à cefalotina, hidrólise do hipurato e hidrólise do indoxil acetato. O método de contagem em placas ISO 10272-2 é idêntico, a partir do plaqueamento em m-CCDA.

O BAM/FDA e o MLG/FSIS/USDA também utilizam a morfologia, arranjo e motilidade típicos para seleção ou descarte das culturas, comprovando a importância dessas características na identificação de *Campylobacter*. Para a confirmação, entretanto, indicam um número maior de testes que, em havendo interesse, podem ser acessados gratuitamente no BAM ou MLG online (endereço eletrônico nas referências).

15.2. MÉTODO PRESENÇA/AUSÊNCIA ISO 10272-1:2006

Método da International Organization for Standardization, aplica-se a todos os alimentos destinados ao consumo humano, às rações animais e à amostras do ambiente de fabricação ou manipulação de alimentos.

Amostras destinadas à detecção de *Campylobacter* devem ser transportadas e estocadas a 3±2ºC e analisadas o mais rapidamente possível. O congelamento não é recomendado, em função da alta sensibilidade desses microrganismos ao congelamento. A desidratação das amostras também deve ser prevenida.

15.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Obrigatórios

- Caldo Bolton
- Ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado (mCCDA)
- Ágar Columbia Sangue (CBA)
- Caldo Brucella
- Reagente de Kovacs para teste de oxidase
- Sistema de geração de atmosfera microaerófila
- Estufa incubadora a 37±1ºC
- Estufa incubadora a 41,5±1ºC
- Estufa incubadora a 25±1ºC

Opcionais

- Ágar Mueller Hinton 5% Sangue
- Peróxido de hidrogênio 3%
- Discos de ácido nalidíxico (30µg)
- Discos de cefalotina (30µg)
- Solução de hipurato de sódio
- Solução de ninidrina
- Discos de indoxil acetato (2,5 a 5,0mg)

15.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema da análise de *Campylobacter* spp pelo método ISO 10272-1:2006 encontra-se descrito na Figura 15.1. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na detecção da presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

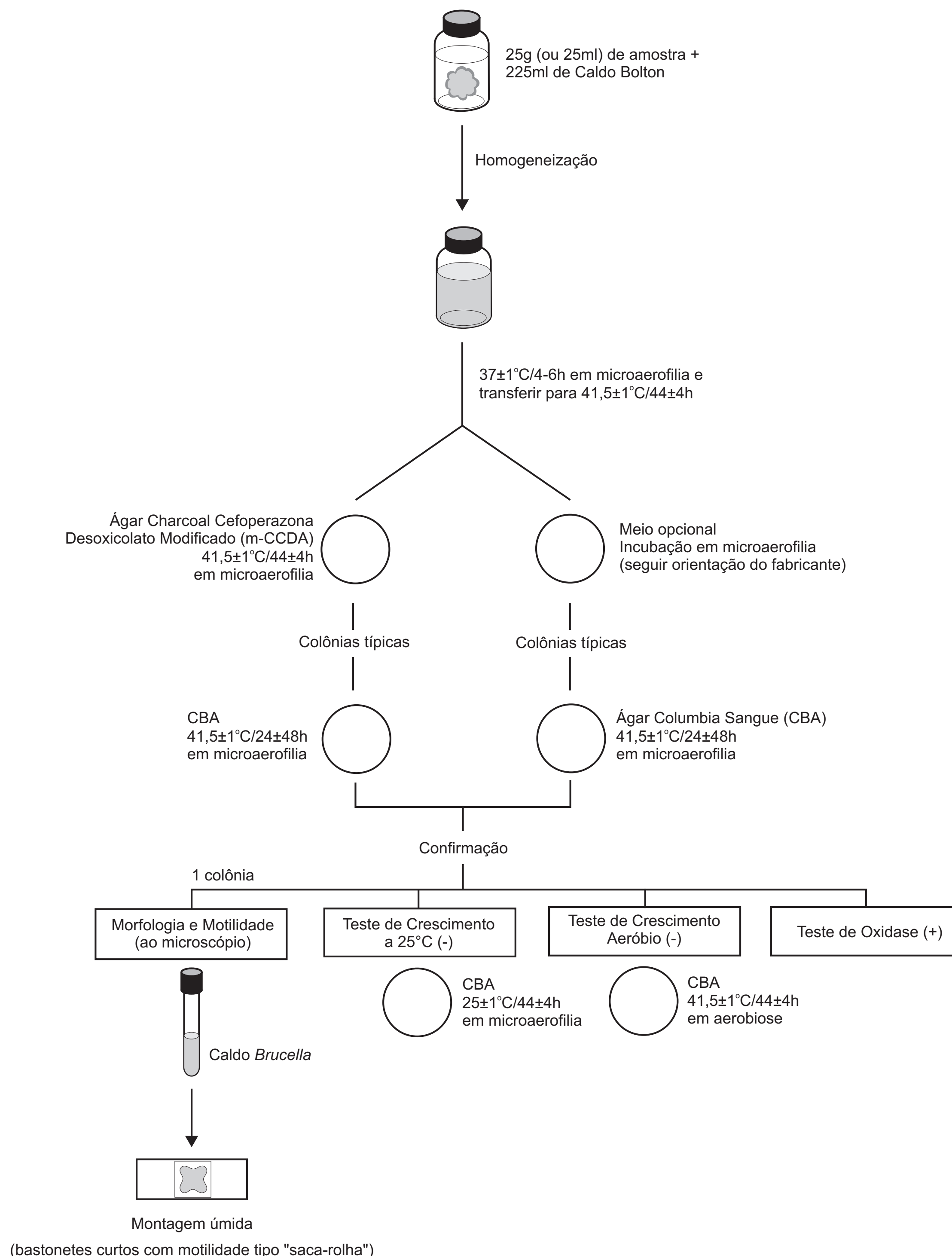


Figura 15.1. Esquema da análise de presença/ausência de *Campylobacter* pelo método ISO 10272-1(2006).

a) Enriquecimento

Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar uma porção de 25g ou 25ml da amostra em 225ml de Caldo Bolton. Incubar em atmosfera microaerófila a 37±1ºC/4-6h e transferir para 41,5±1ºC/44±4h. Composição da atmosfera microaerófila: 5±2% de O_2, 10±3% de CO_2, menos de 10% de H_2 (opcional) e a quantidade de N_2 necessária para completar 100%.

Nota a.1) A quantidade de amostra na unidade analítica pode variar, desde que mantida a diluição 1:10.

Nota a.2) A obtenção da atmosfera microaerófila pode ser feita da forma mais adequada às necessidades do laboratório, incluindo o uso de jarros com "kits" comerciais de geração de gás. Nesse caso, deve ser obedecida a orientação do fabricante, particularmente quanto aos "kits" mais adequados à capacidade dos jarros utilizados. Uma alternativa ao uso de atmosfera microaerófila é fazer a incubação em frascos de tampa de rosca, totalmente preenchidos pela amostra homogeneizada (espaço livre de menos de 2cm) e com as tampas bem apertadas.

b) Plaqueamento diferencial

De cada cultura em Caldo Bolton, estriar uma alçada (estrias de esgotamento) em Ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado (m-CCDA) e uma alçada em um segundo meio, de livre escolha do laboratório. Incubar as placas de m-CCDA a 41,5±1ºC/44±4h, em atmosfera microaerófila. Incubar as placas do segundo meio opcional de acordo com a orientação do fabricante, em atmosfera microaerófila.

Nota b.1) Para selecionar o segundo meio de plaqueamento, a ISO 10272 recomenda optar por meios baseados em princípios diferentes do m-CCDA. O Ágar de Skirrow, o Ágar de Preston ou o Ágar Karmali podem ser utilizados. Seguir as orientações do fabricante para selecionar as colônias típicas no meio opcional.

c) Seleção das colônias e purificação das culturas para a confirmação

Após o período de incubação, verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *Campylobacter* nos meios de plaqueamento diferencial. No Ágar m-CCDA as colônias típicas são acinzentadas, geralmente com brilho metálico, planas e úmidas, com tendência ao espalhamento. Outras formas de colônias podem ocorrer. No segundo meio de plaqueamento, seguir as orientações do fabricante para verificar as características típicas das colônias de *Campylobacter*.

No fundo de cada placa inoculada, marcar cinco colônias típicas para a confirmação e, se houver menos de cinco, marcar todas. Selecionar uma das colônias marcadas, submeter à confirmação e, se o resultado dessa for negativo, submeter as outras à confirmação.

Estriar (estrias de esgotamento) a cultura de cada colônia selecionada em uma placa de Ágar Columbia Sangue (CBA), para purificação. Incubar as placas a 41,5±1ºC/24-48h, em atmosfera microaerófila. Após a incubação, utilizar a cultura em CBA para a realização dos testes de confirmação.

d) Confirmação

d.1) Morfologia e motilidade. A partir das placas de CBA, suspender uma colônia em 1ml de Caldo Brucella e examinar a morfologia e motilidade ao microscópio, em montagens úmidas. Manter para os testes subseqüentes as culturas típicas de *Campylobacter*, que são bastonetes curvos com motilidade tipo "saca rolha". **Cuidado**. Vazamentos para fora da lamínula podem conter uma dose infectiva de *Campylobacter*. Trabalhar com luvas, descartar imediatamente as lâminas em frasco com álcool 70%, descontaminar as bancadas e a mesa e lente do microscópio.

d.2) Teste de crescimento a 25ºC em atmosfera microaerófila. A partir das placas de CBA, estriar uma alçada da cultura em uma nova placa de CBA e incubar a 25±1°C/44±4h, em atmosfera microaerófila. As espécies de *Campylobacter* termotolerantes alvo desse ensaio não crescem a 25ºC.

d.3) Teste de crescimento a 41,5ºC em atmosfera aeróbica. A partir das placas de CBA, estriar uma alçada da cultura em uma nova placa de CBA e incubar a 41,5±1°C/44±4h, em atmosfera aeróbica normal. *Campylobacter* não cresce a em atmosfera aeróbica.

d.4) Teste de oxidase. Colocar um disco ou fita de papel de filtro no interior de uma placa de Petri e embeber o centro do papel com o reagente de Kovacs para teste de oxidase (solução aquosa 1% de cloridrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina). Com uma alça de platina ou palitos estéreis (não utilizar alça de níquel-cromo), remover uma pequena quantidade da cultura em CBA e espalhar sobre o reagente no papel, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor azul intensa, em aproximadamente dez segundos (teste positivo). O não-desenvolvimento da cor azul no intervalo de um minuto indica teste negativo As espécies de *Campylobacter* termotolerantes alvo desse ensaio são oxidase positivas.

e) Identificação da espécie (opcional)

Havendo interesse em identificar a espécie isolada, podem ser utilizados os testes abaixo:

e.1) Teste de catalase. Em uma lâmina de microscópio, depositar uma alçada da cultura em uma gota de peróxido de hidrogênio 3%. Observar a ocorrência de borbulhamento em 30s (teste positivo) ou não (teste negativo).

e.2) Teste de sensibilidade à cefalotina e ao ácido nalidíxico. Suspender uma alçada da cultura em Caldo Brucella, ajustando para 0,5 na escala de McFarland. Diluir a suspensão a 1:10 com o mesmo caldo e cobrir a superfície de uma placa de Ágar Mueller Hinton 5% Sangue com a cultura. Deixar em contato por cinco minutos, drenar o excesso de líquido e secar a placa em estufa, a 37°C/10min. Colocar um disco de ácido nalidíxico (30µg) e um disco de cefalotina (30µg) na superfície da placa e incubar a 37±1°C/22±2h em atmosfera microaerófila, sem inverter. Crescimento da cultura em contato com o disco é considerada resistência, enquanto a presença de uma zona de inibição em redor do disco, de qualquer diâmetro, é considerada sensibilidade.

e.3) Teste de hidrólise do hipurato. Transferir uma alçada com inóculo pesado da cultura para um tubo com 0,4ml de solução de hipurato de sódio, com o cuidado de não carregar ágar junto com o inóculo. Misturar bem por agitação e incubar a 37±1°C/4h em estufa ou 37±1°C/2h em banho maria. Cuidadosamente, adicionar ao tubo 0,2ml de solução de ninidrina, sobre a superfície da solução de hipurato. Não agitar. Reincubar a 37±1°C/10min e observar o desenvolvimento de uma cor violeta escura (teste positivos) ou a não alteração da cor (teste negativo). Cor levemente violeta é considerada negativa.

e.4) Teste de hidrólise do indoxil acetato. Colocar uma alçada da cultura sobre um disco de indoxil acetato (2,5 a 5,0mg) e adicionar uma gota de água destilada. Observar a mudança de cor do disco para azul escuro, em cinco a dez minutos (teste positivo) ou não alteração de cor (teste negativo).

f) Interpretação dos resultados

Considerar como *Campylobacter* spp as culturas que apresentarem características típicas nos testes de confirmação do item d: morfologia de pequenos bastonetes curvos, motilidade tipo "saca rolha, crescimento microaeróbico a 25ºC negativo, crescimento aeróbico a 41,5ºC negativo, teste de oxidase positivo.

Se foram feitos os testes de identificação das espécies, interpretar os resultados de acordo com o Quadro 15.4 abaixo:

Quadro 15.4. Características das espécies de *Campylobacter* termotolerantes nos testes de identificação.

Teste	*C. jejuni*	*C. coli*	*C. lari*	*C. upsaliensis*
Catalase	+	+	+	- ou levemente +
Sensibilidade ao ácido nalidíxico	S[a]	S[a]	Varia	S
Sensibilidade à cefalotina	R	R	R	S
Hidrólise do hipurato	+	-	-	-
Hidrólise do indoxil acetato	+	+	-	+

[a] Tem sido observada elevação na resistência.

15.3. REFERÊNCIAS

BOLTON, F.J., COATES, D., HUTCHINSON, D.N., 1984. The ability of campylobacter media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. **Journal of Applied Bacteriology 56(1)**:151-157.

EUZÉBY, J.P., 2004. *Campylobacter*. In: **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire**, disponível no site <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/campylobacter.html>, acesso em 30/03/06.

GUPTA, A., NELSON, J.M., BARRETT, T.J. *et al.*, 2004. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997-2001. **Emerging Infectious Diseases 10(6)**:1102-1109.

HUNT, J.M., ABEYTA, C. & TRAN, T. *Campylobacter*. In: U S Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Manual Online**, disponível no site <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>,acesso em 23/03/06. Chapter 7, revised March 2001.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. **Microrganisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens**. Blackie Academic & Professional, London (ISBN 0 412 47350 X).

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. **Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN0-306-47262-7).

ISO 10272-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs **– Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter – Part 1: Detection Method, 1th ed**. The International Organization for Standardization, 2006.

ISO 10272-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs **– Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter, – Part 2: Colony Count Technique, 1th ed**. The International Organization for Standardization, 2006.

INFORME-NET DTA, 2003. *Campylobacter jejuni*/Campilobacteriose. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/CAMPYLOBACTER.htm>, acesso em 28/01/06.

ON, S.L.W. & HOLMES, B., 1991. Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of campylobacteria. **J. Clin. Microbiol. 29**:1758-1788.

ON, S.L.W. & HOLMES, B., 1992. Assessment of enzyme detection tests useful in identification of campylobacteria. **J. Clin. Microbiol. 30**:746-749.

ON, S.L.W. & HOLMES, B., 1995.Classification and identification of campylobacters, helicobacters and ellied taxa by numerical analysis of phenotypic characters. **Syst. Appl. Microbiol. 18**:374-390.

PEARSON, A.D. & HEALING, T.D., 1992. The surveillance and control of campylobacter infection. **Communicable Disease Review 2(12)**:R133-R139.

PHAC (Public Health Agency of Canada). Human *Campylobacter* cases. **Canada Communicable Disease Report (CCDR) 29S1**, March 2003. Disponível no site <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmtc/03vol29/29s1/29s1_4e.html>, acesso em 30/03/06.

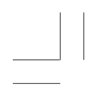
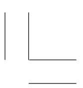
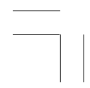
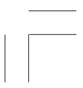
RANSOM, G.M. & ROSE, B.E. Isolation, identification, and enumeration of *Campylobacter jejuni/coli* from meat and poultry products. In: USDA/FSIS **Microbiology Laboratory Guidebook 3rd Ed.**, 1998. Chapter 6, <http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp>, acesso em 30/03/06.

STANLEY, K. & JONES, K., 2003. Cattle and sheep farms as reservoir of *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology 94**:104S-113S.

TAUXE, R.V., HARGRETT-BEAN, N., PATTON, C.M., 1998. *Campylobacter* isolates in the United States, 1982-1986. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 37(SS-2)**:1-13.

VANDAMME, P., DEWHIRST, F.E., PASTER, B.J., ON, S.L.W. Genus I. *Campylobacter*. In: BRENNER, D.J. *et al.* (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed.**, Vol. 2, Part C. Springer, New York, 2005.

WHO (World Health Organization), 2000. *Campylobacter*. **Fact Sheet Nº 255**. Disponível no site <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>, acesso em 30/03/06.

Capítulo 16

Cronobacter

16.1. INTRODUÇÃO

Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) é um gênero de bactérias patogênicas, cujas doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são classificadas pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) no grupo de risco IB, que inclui as doenças "de severo perigo para população restrita, representando ameaça de morte, seqüelas crônicas ou longa duração". A população de risco são crianças de até um ano, particularmente os prematuros e os recém nascidos de baixo peso corporal, que podem sofrer doenças graves. O veículo mais comum das infecções tem sido fórmulas infantis em pó, utilizadas em hospitais e maternidades para a preparação de mamadeiras. A partir das fórmulas em pó, focos de contaminação podem acumular-se em frascos e utensílios usados na preparação das mamadeiras, facilitando a disseminação da bactéria.

Taxonomia

As informações abaixo são de Iversen *et al.* (2007) e Iversen *et al.* (2008).

Cronobacter é um gênero da família *Enterobactericeae*, cujas cepas, até 1980, eram designadas como variantes de *Enterobacter cloacae* pigmentadas de amarelo. Em 1980 Farmer III *et al.* (1980) propôs a alocação dessas cepas numa nova espécie, chamada de *Enterobacter sakazakii*. Iversen *et al.* (2007) propôs a divisão das cepas em várias novas espécies, alocadas em um novo gênero, chamado de *Cronobacter*. Em 2008 foi publicada oficialmente por Iversen *et al.* (2008) a taxonomia do novo gênero e das novas espécies.

Cronobacter Iversen *et al.* 2008, gen. nov.

Morfologia de bastonete, Gram negativo, geralmente móvel com flagelos peritríquios, não esporogênico, anaeróbio facultativo, catalase positivo e oxidase negativo. Reduz o nitrato, utiliza o citrato, hidrolisa a esculina e a arginina e descarboxila a ornitina. Geralmente a fermentação da glicose e outros carboidratos é do tipo butilenoclicólica, produzindo acetoína e apresentando teste de Voges Proskauer (VP) positivo e teste de vermelho de metila (VM) negativo. Não produz H_2S, cresce na faixa de temperatura entre seis e 45ºC e na faixa de pH entre cinco e dez, nenhuma cepa crescendo abaixo de 4,5. Cresce na presença de 7% de NaCl, mas não em 10%.

A diferenciação das cepas de *Cronobacter* de outras espécies da família *Enterobacteriaceae* encontra-se sumariada no Quadro 16.1. A diferenciação entre as espécies de *Cronobacter* encontra-se no Quadro 16.2.

Quadro 16.1. Características bioquímicas de *Cronobacter* spp. e outras enterobactérias .(Iversen *et al.*, 2007)

Espécie	α-GLI	VP	ADH	ODC	SAC	RAF	CEL	ARA	CIT	VM	ADO	SOR	LDC	H_2S
Cronobacter spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Buttiauxella agrestis	v	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Citrobacter koseri	-	-	v	+	v	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Citrobacter freundii	-	-	v	-	v	v	v	+	v	+	-	+	-	+
Edwardsiella tarda	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Enterobacter aerogenes	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Enterobacter asburiae	-	-	v	+	+	v	+	+	+	+	-	+	-	-
Enterobacter cancerogenus	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Enterobacter cloacae	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	v	+	-	-
Enterobacter georgoviae	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Enterobacter hormaechei	-	+	v	+	+	-	+	+	+	v	-	-	-	-
Enterobacter pyrinus	v	v	-	+	+	-	+	+	-	v	-	-	+	-
Enterobacter helveticus	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Enterobacter turicensis	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Escherichia coli	-	-	v	v	v	v	-	+	-	+	-	+	(+)	-
Hafnia alvei	(-)	(+)	-	+	-	-	(-)	+	-	v	-	-	+	-
Klebsiella pneumoniae	(-)	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Kluyvera spp.	v	-	-	+	+	+	+	+	(+)	+	-	v	v	-
Leclercia adecarboxylata	-	-	-	-	v	v	+	+	-	+	+	-	-	-
Morganella morganii	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(-)
Pantoea spp.	-	v	-	-	v	v	v	+	v	v	-	v	-	-
Proteus vulgaris	+	-	-	v	(+)	-	-	-	v	v	-	-	-	+
Providencia spp.	-	-	-	-	v	-	-	-	v	+	v	-	-	v
Rahnella aquatilis	-	-	v	-	+	+	+	+	(-)	-	-	+	-	-
Raoultella terrigena	-	+	-	(-)	+	+	+	+	v	v	+	+	+	-
Salmonella sv.	-	-	v	(+)	-	-	v	(+)	v	+	-	v	(+)	v
Serratia marcescens	v	+	-	+	+	-	-	-	+	(-)	v	+	+	-
Yersinia enterocolitica	-	-	-	+	+	-	v	+	-	+	-	+	-	-

α **-GLI** = produção da enzima á-glicosidase, **VP** = Voges Proskauer, **ADH** = arginina dehidrolase, **ODC** = ornitina descarboxilase, **SAC** = ácido a partir de sacarose, **RAF** = ácido a partir de rafinose, **CEL** = ácido a partir de celobiose, **ARA** = ácido a partir de arabinose, **CIT** = utilização do citrato, **VM** = vermelho de metila, **ADO** = ácido a partir de adonitol, **SOR** = ácido a partir de sorbitol, **LDC** = lisina descarboxilase, **H_2S** = produção de sulfeto de hidrogênio.
+ = 90 a 100% das cepas positivas, **(+)** = 80 a 90% das cepas positivas, **v** = 20 a 80% das cepas positivas, **(-)** = 10 a 20% das cepas positivas, **-** = menos de 10% das cepas positivas.

Características nutricionais e de crescimento

As informações abaixo são de Farmer III *et al.* (1980), Iversen & Forsythe (2003) e Iversen *et al.* (2004).

Cronobacter cresce utilizando glicose ou citrato como únicas fontes de carbono e energia, não apresentando requerimento de vitaminas, aminoácidos ou outros fatores orgânicos de crescimento. Forma cápsulas de material polissacarídico, composto de ácido glicurônico (29-32%), D-glicose (23-30%), D-galactose (19-24%), D-fucose (13-22%) e D-manose (0-8%). Sua condição de anaeróbio facultativo permite crescimento sob atmosfera anaeróbia (jarro ou caixa de luvas sem oxigênio). A temperatura ótima varia na faixa de 37 a 43°C, dependendo do meio de cultura. O tempo de geração a 37°C varia na faixa de 14 a 29 minutos, em diferentes meios de cultura e na faixa de 19 a 21 minutos em fórmula infantil reconstituída. A seis e a 21°C o tempo de geração é

de 13,7 e 1,7h, respectivamente (em fórmula infantil reconstituída), podendo portanto crescer, ainda que lentamente, sob refrigeração.

Quadro 16.2. Características bioquímicas das espécies de *Cronobacter* spp. (Iversen *et al.*, 2008)

Características[a]	*C. sakazakii*	*C. malonaticus*	*C. turicensis*	*Cronobacter* genosp. 1	*C. muytjensii*	*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*	*C. dublinensis* subsp. *lactaridi*	*C. dublinensis* subsp. *lausannensis*
Indol[b]	-	-	-	-	+	+	+	v
Dulcitol[c]	-	-	+	+	+	-	-	-
Lactulose	+	+	+	+	+	+	+	-
Malonato[d]	-	+	+	v	+	+	-	-
Maltitol	+	+	+	+	-	+	+	-
Palatinose	+	+	+	+	v	+	+	+
Putrescina	+	v	+	v	+	+	+	v
Melezitose	-	-	+	-	-	+	-	-
Turanose	+	+	+	v	v	+	v	-
myo-Inositol[c]	v	v	+	+	+	+	+	-
cis-Aconitato	+	+	+	+	v	+	+	+
trans-Acontitato	-	+	-	+	v	+	+	+
1-0-metil-α-D-glicopiranosídeo	+	+	+	+	-	+	+	+
4-Aminobutirato	+	+	+	v	+	+	+	+

+ = 90 a 100% das cepas positivas, **v** = 20 a 80% das cepas positivas, **-** = menos de 10% das cepas positivas.
[a] Dados obtidos usando o Biotype 100 System (BioMérieux) com o Biotype Medium 1, exceto quando especificada outra condição.
[b] Usando reagente de Kovacs após crescimento em caldo triptona.
[c] Dado obtido usando o Biolog Phenotype MicroArray (Biolog).
[d] Usando o Caldo Malonato Fenilalanina.

Características em meios de cultura sólidos à base de peptonas. Como membro da família *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter* cresce em todos os meios seletivos utilizados para isolamento e contagem de enterobactérias, como o Agar MacConkey, o Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB), o Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e outros. Todas as cepas crescem rapidamente em Ágar Trpticase de Soja (TSA) e, após 48h a 25°C, formam colônias de 2 a 3mm de diâmetro, com uma coloração amarela brilhante. Essa pigmentação, intensa à 25°C, é muito reduzida na incubação a 36°C. Quando recém isoladas, as cepas apresentam dois ou mais tipos morfológicos de colônias no primeiro repique de purificação por estrias de esgotamento: colônias secas ou mucóides, com bordas imperfeitas, elásticas e difíceis de remover com uma alça ou agulha de inoculação (tipo A) e colônias lisas e fáceis de remover (tipo B). Culturas estoque feitas a partir de colônias tipo A rapidamente convertem ao tipo B. Algumas cepas também produzem colônias lisas com pigmentação muito fraca, difíceis de reconhecer como amarelas.

Características de crescimento em meios líquidos. O crescimento é rápido em Caldo Tripticase de Soja (TSB), passando de 10^4 a 10^9 em uma noite. A massa de células tende a sedimentar e, observado em montagens úmidas com aumento de 440 vezes, o sedimento é similar ao produzido por *Pantoea agglomerans*, contendo aglomerados de células e massas amorfas (talvez de células aglomeradas). Em Caldo *E. coli* (EC), usado na contagem de coliformes termotolerantes (fecais), 70 a 90% das cepas produzem gás de lactose a 35°C mas apenas 58% o fazem a 44,5°C. Esses dados

indicam que o microrganismo pode não ser detectado no ensaio de coliformes fecais em Caldo EC, que verifica a produção de gás a 44,5-45,5°C.

Resistência térmica. Iversen *et al.* (2004) realizaram uma avaliação da resistência térmica de duas cepas de *Cronobacter* (linhagem tipo e uma linhagem encapsulada) em Caldo Tripticase de Soja (TSB) e em fórmula infantil reconstituída. Os resultados estabeleceram valor D_{58} na faixa de 1,3 a 3,8 minutos e valor D_{62} na faixa de 0,2 a 0,4 minutos, sem diferença significativa entre as linhagens ou entre o TSB e a fórmula infantil reconstituída. O valor z médio obtido para as duas cepas foi de 5,7°C. Esses dados de termotolerância foram considerados pelos autores como similares aos de outras enterobactérias, como *Salmonella* em leite em pó reconstituído. Utilizando os valores de D_{60} (1,1 min) e z (5,7°C) os autores fizeram uma previsão do valor D a 71,2°C, estimado em 0,7 segundos. Com base nessa previsão concluíram que o processo de pasteurização HTST (high temperature short time = 71,7°C/15s) é eficaz contra *Cronobacter*, podendo promover 21 reduções decimais na população alvo.

Epidemiologia

Cronobacter tem causado vários surtos ou casos esporádicos de sepse, meningite neonatal e enterocolite necrozante. A sepse ou septicemia neonatal é caracterizada por sinais sistêmicos de infecção e sua principal complicação, nos recém-nascidos, é a meningite (Ceccon et al.,1999). A enterocolite necrozante neonatal (ECN) é caracterizada por necroses e pneumatoses intestinais, distensão abdominal, vômitos biliosos e hematoquezia, capaz de evoluir para peritonite, pneumoperitonite e choque (Acker, 2001, Vieira & Lopes, 2003). Os mecanismos específicos de virulência de *Cronobacter* são pouco conhecidos, mas o microrganismo parece ter uma propensão a infectar o sistema nervoso central, causando meningite, cistos ou abcessos (FAO/WHO, 2004).

A taxa de mortalidade, segundo a FAO/WHO (2004), têm sido relatada na faixa de 50% ou maior, mas esse valor tem declinado para menos de 20% nos últimos anos. As seqüelas são significativas entre as crianças atingidas, principalmente as que desenvolveram meningite ou cerebrite. Retardo do desenvolvimento e hidrocefalia são bem reconhecidas A infecção geralmente responde ao tratamento com antibióticos, porém, vários autores têm relatado aumento de resistência às drogas comumente usadas no tratamento inicial. A dose infectiva foi estimada por Iversen & Forsythe (2003) na faixa de 1.000 células mas, devido à limitação de informações, ainda não foi possível desenvolver uma curva dose-resposta para este patógeno (FAO/WHO, 2004).

Ecologia

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization) e a OMS (Organização Mundial de Saúde) (FAO/WHO, 2004), o reservatório de *Cronobacter* é desconhecido em muitos casos, porém, um número crescente de relatos confirmam as fórmulas infantis em pó como fonte e veículo de infecções. Um levantamento feito por Muytjens *et al.* (1988) em 141 amostras de fórmulas infantis em pó, originadas de 28 países, detectou a presença de membros da família *Enterobacteriaceae* em 52,5%. As espécies mais freqüentemente encontradas foram *Pantoea agglomerans* (em 35 amostras), *Enterobacter cloacae* (em 30 amostras), *Cronobacter* (em 20 amostras) e *Klebsiella pneumoniae* (em 13 amostras). A contagem desses microrganismos foi menor do que uma UFC/100g em 78% das amostras e as maiores contagens observadas foram de 92 UFC/100g (*E. cloacae*) e 66 UFC/100g (*Cronobacter*).

Nazarowec-White & Farber (1997) avaliaram 120 amostras de fórmulas infantis de três diferentes fabricantes do Canadá, detectando *Cronobacter* em 6,7%. A contagem mais freqüentemente encontrada foi de 0,36 NMP/100g.

Heuvelink *et al.* (2001) avaliaram 40 amostras de fórmulas infantis em 170 amostras de leite em pó (presença/ausência em 25g), detectando *Cronobacter* em uma amostra de fórmula e sete amostras de leite em pó.

No Brasil, Santos *et al.* (2005), em levantamento realizado pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas, SP), analisaram, no período de maio de 2004 a outubro de 2005, 86 amostras de fórmulas infantis em pó, 20 de fórmulas reconstituídas (mamadeiras prontas) e cinco de amido, originárias de hospitais de Campinas (SP), indústrias ou distribuidores. A presença de *Cronobacter* foi detectada em 12 das amostras de fórmula em pó, em quatro das amostras de amido e em nenhuma das mamadeiras. A contagem mais freqüentemente encontrada foi de 0,51 NMP/100g.

De acordo com a FAO/WHO (2004), esses dados indicam que o nível de contaminação das fórmulas infantis por *Cronobacter* é baixo mas, ainda assim, de alto risco, dado o potencial de multiplicação no intervalo entre a preparação e o consumo do produto reconstituído. Com base nas conclusões preliminares da análise de risco microbiológico (risk assessment), a inclusão de uma etapa letal no momento do preparo e a redução do intervalo entre a reconstituição e o consumo reduzem o risco (FAO/WHO, 2004). Iversen & Forsythe (2003), que estimaram a dose infectiva em 1.000 células, destacam também a importância da higiene dos utensílios usados na preparação, como liqüidificadores, por exemplo. Segundo esses autores, considerando a baixa contagem de *Cronobacter* no produto em pó (0,36 UFC/100g na maioria dos relatos) e o tempo necessário para que essa contagem alcance a dose infectiva no produto reconstituído, é muito mais provável que focos do microrganismo nos utensílios sejam a principal fonte de contaminação das mamadeiras e porções servidas. De fato, na investigação de vários surtos e casos esporádicos, o microrganismo foi isolado dos liqüidificadores, frascos, escovas de limpeza e outros itens do ambiente de preparação (Kandhai *et al.*, 2004).

Nos ingredientes usados na formulação de alimentos infantis (leite em pó, amido, lactose, sacarose, lecitina, vitaminas), a FAO/WHO (2004) destaca que vários apresentam alto risco de conter *Enterobacteriaceae* (amido, por exemplo), enquanto outros não (óleos, por exemplo). No levantamento apresentado nessa publicação, o amido e a lactose foram os mais freqüentemente contaminados com enterobactérias e *Cronobacter*.

Além das fórmulas infantis e seus ingredientes, Iversen & Forsythe (2003) destacam alguns relatos de isolamento de *Cronobacter* em queijo, pão fermentado, tofu, chá azedo, carnes curadas, carne moída, lingüiça e pão tipo Khamir (o organismo faz parte da microbiota superficial da semente de sorgo e também da semente de arroz). Considerando que *Cronobacter* não faz parte da microbiota normal do homem e outros animais, é provável que o solo, a água e os vegetais sejam as principais fontes de contaminação dos alimentos e que ratos e moscas sejam fontes adicionais de contaminação (Iversen & Forsythe, 2003). Ainda segundo os autores, é plausível supor que o organismos ocorra em uma gama maior de alimentos, porém, não há estudos detalhados que comprovem isso, até o momento. Destacam, entretanto, que há variação na eficiência dos métodos de isolamento utilizados e que os levantamentos existentes provavelmente subestimam a prevalência e a concentração de *Cronobacter* nos alimentos.

No ambiente doméstico e industrial (fábricas de leite em pó, chocolate, cereais, condimentos, massas e farinhas), Kandhai *et al.* (2004) analisaram 147 amostras e detectaram *Cronobacter* em 35 (24%). O microrganismo foi encontrado em quase todos os ambientes e a análise estatística mostrou não haver diferença significativa na proporção de amostras positivas entre os ambientes. Segundo os autores, esses dados são uma forte indicação de que *Cronobacter* é um microrganismo amplamente distribuído no ambiente doméstico e nas fábricas de alimentos.

Na água, solo, lodo, fezes de pássaro, roedores, animais domésticos e gado, Nazarowec-White & Farber (1997) não conseguiram isolar este microrganismo de nenhuma amostra.

Em 2008 foi feito um levantamento de dados para FAO/OMS, em que laboratórios de oito países, incluindo o do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL/Brasil), analisaram amostras locais de fórmulas infantis, alimentos infantis e bebidas infantis, para a presença de *Cronobacter*. Esse estudo foi publicado por Chap *et* al. (2009), encontrando *Cronobacter* em três de 89 amostras de fórmulas infantis (3%), conforme definidas no Codex Alimentarius (CAC/RCP 66, 2008 revisão 1 2009), e em 24 de 170 amostras de outros alimentos e bebidas infantis (14%). Nesse estudo a unidade analítica utilizada nos ensaios foi de 25g.

Padrão do Codex Alimentarius para *Cronobacter* sp em fórmulas infantis

O Codex Alimentarius estabeleceu o "Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children" (Codex Alimentarius/CAC/RCP 66, 2008 revisão 1 2009), definindo o plano de amostragem de lotes e o padrão microbiológico de fórmulas infantis em pó (produto acabado). O escopo desse código abrange os seguintes produtos em pó:

- Fórmulas infantis e fórmulas para finalidades médicas especiais, a serem usadas como a única fonte de nutrição.
- Fórmulas infantis de seguimento, a serem usadas em combinação com outros alimentos, como parte da dieta de amamentação de crianças.
- Fórmulas em pó para finalidades médicas especiais, destinadas a substituir ou suplementar parcialmente o leite materno, as fórmulas infantis ou as fórmulas da continuação.
- Fortificadores do leite materno, destinados a suplementar o leite de peito.

Além de *Cronobacter*, o Codex também incluiu os ensaios de *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* e aeróbios mesófilos totais, para a avaliação de lotes de produto final (Quadro 16.3).

Quadro 16.3. Critérios microbiológicos do Codex Alimentarius para lotes de fórmulas infantis em pó (produto acabado) (Codex Alimentarius/CAC/RCP 66, 2008 revisão 1 2009).

Microrganismo	n	c	m	M	Tipo de plano
Cronobacter sp	30	0	ausência em 10g	não se aplica	duas classes
Salmonella	60	0	ausência em 25g	não se aplica	duas classes
Enterobacteriaceae	10	2	ausência em 10g	não se aplica	duas classes
Aeróbios mesófilos totais	5	2	$5,0x10^2$ UFC/g	$5,0x10^3$ UFC/g	três classes

n: é o número de unidades de amostras a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote, para serem analisadas individualmente.
m: é o padrão microbiológico.
M: é um limite tolerável, acima do padrão, que pode ser atingido por algumas (**c**) unidades de amostra, mas não pode ser ultrapassado por nenhuma.
c: dentre as **n** unidades de amostra que constituem a amostra representativa do lote, **c** é o número máximo de unidades que podem ser aceitas com contagens acima do padrão **m**, desde que não acima do limite **M**. Nos casos em que o padrão microbiológico é ausência, **c** é igual a zero e aplica-se o plano de duas classes.

Métodos de análise

Em 2006 a International Organization for Standardization publicou a ISO/TS 22964 (2006), para a detecção da presença/ausência de *Cronobacter* em fórmulas infantis, leite em pó e amostras do ambiente de fabricação desses produtos. O método segue quatro etapas: O pré enriquecimento, para a reparação de células injuriadas, o enriquecimento seletivo, para elevar a população alvo a

níveis detectáveis, o plaqueamento seletivo diferencial, para obtenção de colônias com características típicas e a confirmação, para verificar se as culturas isoladas são de *Cronobacter*.

O pré enriquecimento é feito em Água Peptonada Tamponada (BPW), podendo ser aplicado a qualquer tipo de amostra e utilizado no ensaio simultâneo de *Salmonella*. A norma não especifica a quantidade de amostra a ser inoculada, mas remete-se à ISO 8261 (2001) que, para fórmulas infantis e leite em pó, recomenda 10g. Essa quantidade é a mínima necessária, não havendo impedimentos ao uso de quantidades maiores, em uma única alíquota (presença/ausência) ou múltiplas alíquotas (NMP), desde que mantida a diluição de 1:10.

O enriquecimento seletivo é feito em Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (m-LST-V), que contém 3,4% (p/v) de NaCl e 10mg/l de vancomicina. O caldo LST original não contém vancomicina e o teor de sal é de 0,5%. É o meio tradicionalmente utilizado para a contagem de coliformes em alimentos pelo NMP, incubado a 35ºC/24h. A elevação do teor de sal e a incubação a 44ºC criam condições mais competitivas para *Cronobacter* , em relação às enterobactérias. *Cronobacter* cresce a 44ºC (Brenner *et al.*, 2005), ao contrário de inúmeros coliformes e, segundo Breeuwer *et al.* (2003), também é mais resistente à secagem e à pressão osmótica do que *E. coli*, *Salmonella* e outras enterobactérias. A vancomicina normalmente é adicionada aos meios de cultura para inibir bactérias Gram positivas.

O plaqueamento diferencial é feito no Ágar de Isolamento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA), meio seletivo diferencial que contém desoxicolato de sódio e cristal violeta, agentes usados em meios de isolamento de enterobactérias, para inibir Gram positivos. Contém ainda 5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-glicopiranosídeo, um substrato cromogênico para a α-glicosidase. As colônias das cepas que produzem α-glicosidase são verde azuladas, podendo ser diferenciadas das que não produzem a enzima. Essa primeira triagem é seguida da observação da produção de pigmento amarelo em TSA, aumentando significativamente a probabilidade de selecionar as culturas de *Cronobacter*. As provas bioquímicas recomendadas são as mais discriminatórias para diferenciar *Cronobacter* das outras enterobactérias que produzem α-glicosidase e pigmento amarelo.

16.2. MÉTODO DE PRESENÇA/AUSÊNCIA ISO/TS 22964 (2006)

Esse método é aplicável a leite em pó, fórmulas infantis em pó e amostras do ambiente de fabricação desses produtos.

16.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Caldo de pré enriquecimento: Água Peptonada Tamponada (BPW)
- Caldo de enriquecimento seletivo: Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (m-LST-V)
- Placas de Ágar de Isolamento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA)
- Placas de Ágar Tripticase de Soja (TSA)
- Reagente de Kovacs para teste de oxidase (solução aquosa 1% de cloridrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina)
- Alça de platina ou palitos estéreis para teste de oxidase
- "Kits" API 20E (BioMérieux) ou os meios abaixo para provas bioquímicas:
  - Caldo Descarboxilase 0,5% L-Lisina
  - Caldo Descarboxilase 0,5% L-Ornitina
  - Caldo Descarboxilase 0,5% L-Arginina
  - Caldo Vermelho de Fenol D-Sorbitol

Caldo Vermelho de Fenol L-Rhamnose
Caldo Vermelho de Fenol D-Sacarose
Caldo Vermelho de Fenol D-Melibiose
Caldo Vermelho de Fenol Amidaglina
Ágar Citrato de Simmons

- Banho-maria ou estufa incubadora regulada a 44±0,5ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 44±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 37±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 30±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 25±1ºC com termômetro calibrado

16.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para detecção de *Cronobacter* pelo método da ISO 22964 (2006) encontra-se descrito na Figura 16.1.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos nos testes de presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Pré Enriquecimento

Preparar a diluição 1:10, homogeneizando *m* gramas da amostra com *9m* mililitros de Água Peptonada Tamponada (BPW). Não agitar as amostras de leite ou fórmula infantil em pó, aguardando que o material disperse naturalmente. Se a amostra não estiver completamente dissolvida depois de 30minutos, agitar levemente para completar a dissolução. Incubar os frascos de BPW a 37±1ºC/18±2h.

Nota a.1) O procedimento descrito é um teste de presença/ausência, que pode ser adaptados para contagem pelo NMP. No caso de leite ou fórmulas infantis em pó, podem ser analisadas separadamente cinco alíquotas de 100g da amostra, por exemplo, num teste de diluição única, ou três alíquotas de 100g, três de 10g e três de 1g da amostra, num teste de diluição múltipla.

Nota a.2) A ISO 22964 (2006) não especifica a quantidade de amostra a ser analisada que, segundo a ISO 8261 (2001) deve ser de no mínimo 10g para produtos lácteos. No levantamento feito por Chap *et al.* (2009) para a FAO/OMS, com amostras de oito países, a unidade analítica foi de 25g.

b) Enriquecimento seletivo

De cada alíquota pré enriquecida, transferir 0,1ml para 10ml de Caldo Lauril Sulfato Triptose Modificado Vancomicina (mLST-V). Incubar os frascos de m-LST-V a 44±0,5ºC/24±2h.

c) Plaqueamento seletivo diferencial

Agitar cuidadosamente os frascos de caldo m-LST-V e estriar uma alçada de cada cultura (estrias de esgotamento) em uma placa de Agar de Isolamento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA). Incubar as placas 44±1ºC/24±2h.

d) Confirmação das colônias típicas

Selecionar uma a cinco colônias típicas para os testes de confirmação. As colônias de *Cronobacter* em ESIA são pequenas a médias (1 a 3mm), verdes ou verde azuladas. As colônias

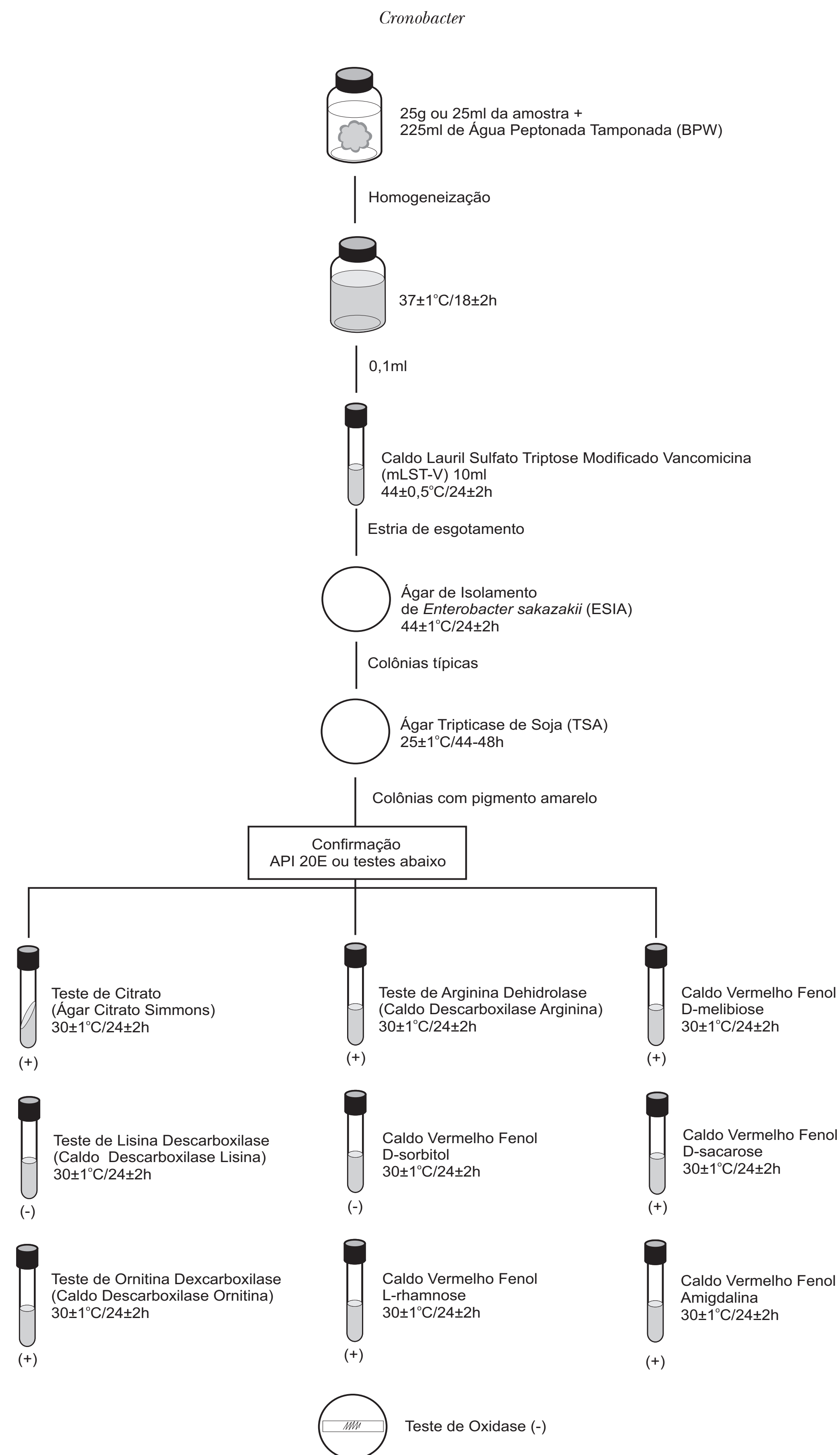


Figura 16.1. Esquema geral de análise para detecção de *Cronobacter* pelo método ISO 22964 (2006).

atípicas geralmente são violeta e levemente transparentes. Se for selecionada apenas uma colônia, manter a placa de ESIA sob refrigeração, para a seleção de novas colônias se a primeira não for confirmada.

Estriar cada colônia selecionada (estrias de esgotamento) em uma placa de Ágar Trpticase de Soja (TSA) e incubar a 25±1°C/44-48h. Após a incubação, verificar a presença ou não de colônias pigmentadas de amarelo. Em caso negativo e, se apenas uma colônia de ESIA foi selecionada para a confirmação, repetir esse procedimento com mais quatro colônias típicas da placa de ESIA. Se houver menos de quatro, selecionar todas.

De cada placa de TSA, selecionar uma colônia pigmentada de amarelo e submeter aos teste bioquímicos descritos abaixo, para confirmação. Utilizar o material da mesma colônia, para a realização de todos os teste bioquímicos, que podem ser substituídos pelos disponíveis em "kits" miniaturizados de identificação, como o API 20E da BioMérieux ou equivalente.

d.1) Teste de oxidase. Colocar um disco ou fita de papel de filtro no interior de uma placa de Petri e embeber o centro do papel com o reagente de Kovacs para teste de oxidase (solução aquosa 1% de cloridrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina). De preferência, utilizar discos ou tiras impregnados com o reagente, disponíveis comercialmente. Com uma alça de platina ou palitos estéreis, remover uma pequena quantidade da cultura e espalhar sobre o reagente no papel, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor azul intensa, em aproximadamente 10 segundos (teste positivo). O não-desenvolvimento da cor azul no intervalo de um minuto indica teste negativo. As cepas de *Cronobacter* são oxidase negativas. **Atenção**. Não devem ser utilizadas alças de níquel-cromo na transferência do inóculo para o teste de oxidase. Não considerar qualquer alteração da cor do reagente após um minuto de contato com a cultura. Não cultivar culturas destinadas ao teste de oxidase em meios contendo glucose, pois a fermentação desse carboidrato inibe a atividade de oxidase e pode resultar em falsas reações negativas. O reagente de Kovacs é instável, devendo ser preparado no dia do uso. Havendo interesse em estocar, deve-se distribuir porções de 1-2ml em frascos escuros e manter sob congelamento (-20°C) até o momento do uso. O descongelamento deve ser feito 3 a 4 horas antes do uso e todo o volume descongelado não utilizado deve ser descartado.

d.2) Teste de citrato. Inocular cada cultura em tubos de Ágar Citrato de Simmons, por estrias na rampa. Incubar os tubos a 30±1°C/24±2h e observar se ocorre desenvolvimento de cor azul (teste positivo) ou não (teste negativo).

d.3) Teste de arginina dehidrolase e lisina/ornitina descarboxilase. Inocular cada cultura em tubos de Caldo Descarboxilase com 0,5% de L-Lisina, Descarboxilase com 0,5% de L-Ornitina e Descarboxilase com 0,5% de L-Arginina. Depositar o inóculo logo abaixo da superfície do líquido e incubar os tubos a 30±1°C/24±2h. O bservar se ocorre desenvolvimento de cor violeta (teste positivo) ou amarela (teste negativo).

d.4. Teste de fermentação de carboidratos. Inocular cada cultura em tubos de Caldo Vermelho de Fenol Carboidratos (D-Sorbitol, L-Rhamnose, D-Sacarose, D-Melibiose, Amigdalina), logo abaixo da superfície do líquido. Incubar os tubos a 30±1°C/24±2h e observar se ocorre desenvolvimento de cor amarela (teste positivo) ou vermelha (teste negativo).

e) Interpretação dos resultados

Considerar como confirmadas as culturas com o seguinte perfil bioquímico:

Oxidase (-)	L-Rhamnose (+)
Lisina descarboxilase (-)	D-Sacarose (+)
Ornitina descarboxilase (+)	D-Melibiose (+)
Arginina dehidrolase (+)	Amigdalina (+)
Sorbitol (-)	Citrato (+)

16.3. REFERÊNCIAS

ACKER, J. V., SMET, F., MUYLDERMANS, G., BOUGATEF, A., NAESSENS, A., LAUWERS, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. **Journal of Clinical Microbiology, 39**:293-297.

BREEUWER P, LARDEAU A, PETERZ, M & JOOSTEN, H.M., 2003. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology 95(5)**:967-973.

BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005.

CECCON, M. E. J., FEFERBAUM, R. GIOLO, C. R. *et al.*, 1999. Sepse neonatal – análise comparativa entre duas décadas (1977-1988 e 1988-1998) em relação à incidência dos agentes etiológicos e da morbimortalidade. **Pediatria 21(4)**:287-297.

CHAP, J., JACKSON, P., SIQUEIRA, R., *et al.*, 2009. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. **International Journal of Food Microbiology, 136(2)**:185-188.

CODEX ALIMENTARIUS/CAC/RCP 66: 2008 revisão 1: 2009. **Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children**. Disponível no site <http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp>, acesso em 10/03/10.

FAO/WHO, 2004. Joint FAO/WHO **Workshop on *Enterobacter sakazakii***, and other microorganims in powdered infant formula. Food and Agriculture Organization / World Health Organization, disponível no site: http:/www.who.int/foodsafety/micro/meetings/feb2004/en.

FARMER III, J. J., ASBURY, M. A., HICKMAN, F. W., BRENNER, D. J., and THE *ENTEROBACTERIACEAE STUDY GROUP*. 1980. *Enterobacter sakazakii*: a new species of "*Enterobacteriaceae*" *isolated from clinical specimens.* International **International Journal of Systemactic Bacteriology, 30(3)**: 569-584.

HEUVELINK, A.E., KODDE, F.D., ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M. & de BOER, E., 2001. *Enterobacter sakazakii* in melkpoeder. **Citado por IVERSEN & FORSYTHE (2003)**.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. **Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN0-306-47262-7).

ISO 8261/IDF 122. **Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination 2nd ed.** The International Organization for Standardization, 2001.

ISO/TS 22964:2006(E). **Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*.** The International Organization for Standardization, 2006.

IVERSEN, C. & FORSYTHE, S. 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology 14**:443-454.

IVERSEN, C., LANE, M. & FORSYTHE, S., 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology 38**:378-382.

IVERSEN, C., LEHNER, A., MULLANE, N., BIDLAS, E., CLEENWERCK, I., MARUGG, J., FANNING, S., STEPHAN, R., JOOSTEN, H., 2007. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. **BMC Evolutionary Biology 7**:64.

IVERSEN, C., MULLANE N., McCARDELL, B.,TALL, B.D., LEHNER, A., FANNING, S., STEPHAN, R., JOOSTEN, H., 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology 58**: 1442-1447.

KANDHAI, M. C., REIJ, M. W., GORRIS, LEON G. M., GUILLUME-GENTIL, º, SCHOTHORST, M. V. 2004. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. **The Lancet 363**:39-40

MUYTJENS, H. L., ROELOFS-WILLEMSE, H., JASPAR, G. H. J. 1988. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology, 26**:743-746.

NAZAROWEC-WHITE, M., FARBER, J. M. 1997. Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. **Journal of Food Protection, 60(3)**: 226-230.

SANTOS, R.F.S, SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A. *et.al*. Incidência de *Enterobacter sakazakii* em alimentos infantis. **Anais do 3º Simpósio em Ciências de Alimentos**, Florianópolis, 2005. Trabalho No 424

VIEIRA, M. T. C., LOPES, J. M. A. 2003. Fatores associados à enterocolite necrosante. **Jornal de Pediatria; 79(2)**:159-164.

Capítulo 17

Escherichia coli O157:H7

17.1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli O157:H7 é uma bactéria patogênica, cujas doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são classificadas pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) no grupo de risco IA, que inclui as doenças " de severo perigo para a população em geral, representando risco de morte, seqüelas crônicas ou longa duração".

As cepas desse sorotipo fazem parte da classe das *E. coli* Shiga Toxigênicas (STEC), também chamadas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) ou *E. coli* verotoxigênicas (VTEC). Esse grupo compreende as cepas produtora de verotoxinas (incluindo a *E. coli* O157:H7), associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades. A síndrome é decorrente da adesão da bactéria às células do epitélio intestinal e à ação de citotoxinas produzidas no intestino do individuo infectado. No momento são conhecidas pelo menos duas citotoxinas diferentes, chamadas de verotoxinas (VT 1 e 2) devido ao seu efeito citopático irreversível sobre células Vero (linhagem de células do rim do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*) (Eduardo *et al.*, 2002). Também são chamadas de toxinas shiga ou "shiga-like" toxinas (SLT 1 e 2), devido à semelhança com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I (Weagant *et al.*, 1995). Os genes responsáveis pela codificação das toxinas shiga, chamados *stx1* e *stx2*, são usados como marcadores em métodos moleculares de detecção ou confirmação de cepas STEC.

Sorotipagem

As informações abaixo são do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner *et al.*, 2005). A sorotipagem de *E. coli*, assim como a de *Salmonella*, é baseada nas diferenças antigênicas encontrada no envelope celular ou cápsula (antígenos K), na parede celular (antígenos O) e nos flagelos (antígenos H). Cada sorotipo é designado por uma fórmula contendo 1º) os antígenos somáticos, 2º) os antígenos capsulares e 3º) os antígenos flagelares. As fímbrias, quando presentes, também podem ser usadas para a caracterização sorológica. *E. coli* O157:H7 significa antígeno somático O157, antígeno capsular ausente e antígeno flagelar H7.

Os antígenos somáticos "O" têm sua base química na diversidade de polissacarídeos da parede celular das bactérias Gram negativas. A parede celular é composta de uma camada interna de peptidoglicano, seguida de uma dupla camada lipídica externa, composta de lipoproteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são a parte mais externa da parede celular e têm a função de proteger as células dos fatores ambientais. São divididos em três porções, o lipídio A, interno, o core, intermediário e uma cadeia polissacarídica externa, que constitui a parte imunologicamente dominante da molécula (região antigênica "O"). Os fatores antigênicos são designados por números que vão de um a 173, mas os fatores O31, O47, O67, O72, O93, O94 e O122 foram excluídos.

Os antígenos "K" são os polissacarídeos capsulares (CPS), havendo 60 fatores conhecidos, separados em dois grupos distintos. Os antígenos do grupo I são compostos de CPS de alto peso molecular, encontrados apenas em cepas dos sorotipos somáticos O8, O9, O20 e O101. Esses antígenos são expressados tanto a 18 quanto a 37ºC. Porções do CPS de vários antígenos do grupo I são ligados ao core dos LPS, sendo chamados de K_{LPS} e apresentando comportamento similar aos antígenos somáticos. O antígeno K84, por exemplo, pode ser operacionalmente definido como um antígeno O e foi originalmente designado como O93. Os antígenos do grupo II são compostos de baixo peso molecular, subdivididos de acordo com a presença (IA) ou ausência (IB) de aminoaçúcares nos CPS. Os antígenos IA de *E. coli* são idênticos ou muito semelhantes aos de *Klebsiella* spp, enquanto os IB são únicos de *E. coli*, sem semelhança com os de outras bactérias. Vários antígenos do grupo II (20 a 50%) são ligados aos fosfolipídeos da parede celular. Inicialmente, pensava-se que esses antígenos fossem dependentes da temperatura, sendo expressados apenas a 37ºC. Entretanto, vários fatores não apresentam regulação pela temperatura.

Os antígenos flagelares "H", derivados do flagelo das cepas móveis, são termossensíveis (não resistem à temperatura de 100ºC/1h). A proteína flagelar (flagelina) carrega os fatores antigênicos, designados por números que vão de 1 a 56, mas os fatores H13 e H22 foram removidos.

Patogenicidade

Atualmente há seis grupos de *E. coli* enteropatogênicas reconhecidos: 1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), 2) *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), 3) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), 4) *E. coli* enteroagregativa (EAggEC ou EAEC), 5) *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e 6) *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) (Brenner *et al.*, 2005).

Na classe STEC, da qual fazem parte as cepas de *E. coli* O157:H7, há cerca de 200 sorotipos de *E. coli* produtoras de verotoxinas (WHO, 1998), responsáveis por um amplo espectro de doenças, que vão de diarréias brandas à colite hemorrágica e doenças mais graves como a síndrome hemolítico-urêmica (HUS) e a púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (Eduardo *et al.*, 2002).

Colite hemorrágica. De acordo com a FDA/CFSAN (2001), a colite hemorrágica provocada pelas cepas STEC é caracterizada por dores abdominais severas e diarréia, inicialmente aquosa e posteriormente sanguinolenta. Ocasionalmente ocorre vômito ou febre baixa. A doença é geralmente auto-limitada, durando cerca de oito dias e alguns indivíduos apresentam apenas diarréia aquosa. A dose infectiva é ainda desconhecida mas, de acordo com dados obtidos de surtos, parece ser similar à da *Shigella* (10 células). Outras fontes relatam valores na faixa de 10 a 10.000 células por grama ou mililitro do produto consumido (CDC, 1993, Lior, 1994). A população alvo pode ser de qualquer faixa etária, sendo maiores os riscos para idosos, crianças menores de cinco anos, indivíduos imunodeprimidos ou com problemas renais (Weagant *et al.*, 1995). A transmissão pode ocorrer por contato direto (contato com gado infectado ou suas fezes e contato pessoa-pessoa) ou indireto, através do consumo de alimentos contaminados (USDA, 1994).

Síndrome hemolítico-urêmica (HUS). De acordo com a literatura, cerca de 10% dos casos de colite hemorrágica podem agravar-se, provocando um quadro conhecido como síndrome hemolítico-urêmica (HUS), geralmente diagnosticado de dois a 14 dias após o início da diarréia. É caracterizada pelo desenvolvimento de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, insuficiência renal aguda e distúrbios do sistema nervoso central como letargia, dor de cabeça severa, convulsões e encefalopatia (Eduardo *et al.*, 2002). A anemia hemolítica decorre de um baixo número de glóbulos vermelhos no sangue, resultante da sua desintegração prematura no interior dos vasos sangüíneos. A hemoglobina não aproveitada é filtrada e expelida pelos rins,

deixando a urina escura. Se o volume de destruição for mínimo, o resultado será a letargia; se for aguda, poderá acarretar a morte (Medlineplus, 2006). A trombocitopenia decorre da redução do número de plaquetas no sangue, causada por distúrbios na sua produção, distribuição ou destruição. Provoca púrpura (manchas roxas na pele), ocasionadas pelo sangramento de pequenos vasos sangüíneos próximos da superfície. Quando muito pequenas, as manchas roxas são chamadas de petéquias; quando grandes, de equimoses (Medlineplus, 2006). A insuficiência renal afeta a grande maioria dos pacientes de HUS, 25% apresentando hipertensão arterial e manifestações neurológicas (irritabilidade, letargia, convulsões e coma). Alterações em outros órgãos como o pâncreas e o coração também têm sido relatadas com bastante freqüência (Eduardo *et al.*, 2002).

A HUS pode ocorrer em pacientes de qualquer faixa etária, mas crianças e idosos parecem ser mais suscetíveis. No Brasil a incidência não é conhecida, mas, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, há vários anos tem sido a causa mais comum de insuficiência renal em crianças na Argentina, onde cerca de 250 novos casos são relatados anualmente (WHO, 1997). A taxa de mortalidade encontra-se na faixa de dois a 7%, mas em alguns surtos, especialmente entre os idosos, chega a 50% (WHO, 1997). Outra conseqüência grave desta doença é o número significativo de sobreviventes que apresentam seqüelas permanentes, como insuficiência renal crônica, hipertensão e problemas neurológicos (Paton & Paton, 1998). Como não há uma terapia específica para a HUS, a maioria dos pacientes requer tratamento prolongado, envolvendo diálise, transfusão de sangue ou transplante dos rins (USDA, 1994, Weagant *et al.*, 1995).

Púrpura trombocitopênica trombótica (PTT). PTT é outra complicação extra intestinal que pode ocorrer nas infecções causadas pelas cepas EHEC. É uma doença mais rara, caracterizada por cinco sinais e sintomas: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, distúrbios neurológicos, febre e disfunção renal (Eduardo *et al.*, 2002). Os sintomas neurológicos podem ser cefaléia, confusão, afasia e alterações da consciência (da letargia ao coma) (Rocha, 2003).

Sorotipos STEC mais envolvidos em surtos

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), o sorotipo O157:H7 é o mais freqüentemente associado a surtos relatados e documentados de colite hemorrágica e HUS. Há, entretanto, indicações claras de que o envolvimento de cepas de outros sorotipos está crescendo. Os dados epidemiológicos disponíveis sugerem que o sorotipo O157:H7 é predominante nos Estados Unidos, Canada, Reino Unido e Japão, enquanto na América do Sul, Austrália e Europa continental os sorotipos não-O157 são mais comuns.

Dados desse mesmo relatório indicam que, em indivíduos com diarréia, as cepas não-O157 têm sido isoladas com freqüência média quatro vezes maior do que a O157, embora tenha sido observada uma grande variação nessa proporção, de uma região geográfica para outra. Nos Estados Unidos, ao contrário, a O157 é encontrada com freqüência duas vezes maior do que as demais STEC. Com relação ao casos de HUS estudados em todo o primeiro mundo, as cepas não-O157 responderam, em média, por 25% das cepas STEC implicadas nas ocorrências. Também nesse caso, essa proporção apresentou grandes diferenças de uma região para outra, variando de sete a 90% (WHO, 1998).

No Brasil, levantando-se apenas os casos de diarréia em humanos, a freqüência de isolamento de cepas STEC é muito baixa (Cantarelli *et al.*, 2000, Guth *et al.*, 2002a, Irino *et al.*, 2002), porém, comparável à observada em outras partes do mundo (Huppertz *et al.*, 1996, Piérard *et al.*, 1997, Beutin *et al.*, 1998). Desde 1989 o sorotipo O111:NM é o mais freqüente em nosso ambiente (Guth *et al.*, 2002a), porém, dois casos de doença associados com os sorotipos O157:H7 e O26:H11 já foram identificados (Irino *et al.*, 2000, Guth *et al.*, 2002b). Em reservatórios animais,

ao contrário, as cepas STEC são bastante comuns (Cerqueira *et al.*, 1997, Cerqueira *et al.*, 1999), embora poucos dos sorotipos isolados sejam reconhecidos como patógenos.

Um fato importante a destacar é que, embora o isolamento de cepas não-O157 seja bastante comum em todo o mundo, nem todos os sorotipos STEC ocorrem com a mesma freqüência. Dentre os quase 200 existentes, cerca de 50 têm sido isolados de pacientes (Nataro & Kaper, 1998) e, em muitos casos, não é certo que tenham sido a causa da doença, sendo também encontradas em indivíduos sãos. Além disso, há vários relatos de pacientes apresentando cepas não O-157 nas fezes e, ao mesmo tempo, altos níveis de anticorpos contra o antígeno O157 (Tarr & Neill, 1996), sugerindo a presença desse sorotipo como causa dos sintomas, embora não detectado.

O fato é que distinguir as cepas STEC verdadeiramente patogênicas não é tão simples, uma vez que a mera produção das verotoxinas não é suficiente para conferir virulência, havendo outros fatores envolvidos. Isso tem reflexos sobre a nomenclatura desse grupo, sendo reconhecida a seguinte situação (Nataro & Kaper, 1998): STEC e VTEC são termos equivalentes e ambos se referem a todas as cepas de *E. coli* que produzem uma ou mais verotoxinas. Como não está claro se a simples presença dos genes que codificam essas toxinas é capaz de conferir patogênicidade, na ausência de outros fatores de virulência, o termo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) fica reservado às cepas que provocam colite hemorrágica, HUS ou PTT, produzem toxinas shiga, aderem às células do epitélio intestinal, provocam lesões A/E ("attaching and effacing") e possuem o plasmídio pO157, associado à produção de enterohemolisinas e potenciais fatores de aderência. Dessa forma, EHEC denota um subgrupo da classe STEC e inclui uma conotação clínica não extensiva a todo o grupo. De acordo com essa definição, todas as cepas EHEC são patogênicas, sendo seu principal representante o sorotipo O157. Os outros sorotipos que têm sido associados às manifestações clínicas mais graves são o O111:H8/NM (predominante na Austrália), o O26:H11, o O103:H2 e o O113:H21 (Griffin & Tauxe, 1991, WHO, 1998, Eduardo *et al.*, 2002).

E. coli O157:H7 em alimentos

O trato intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório das cepas entero-hemorrágicas de *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O157:NM. Nesse tipo de animais, a incidência em fezes varia na faixa de zero a 10%, uma variação ampla que pode ser devida à diferenças na sensibilidade dos métodos de detecção empregados (Sanderson *et al.*, 1995). Em suínos e aves, a presença parece não ser comum, embora já tenha sido isolada do intestino desse tipo de animal (Meng *et al.*, 1994).

Já foram incriminados em surtos, dentre outros alimentos, a carne bovina mal-cozida e outros produtos à base de carne (rosbifes, hambúrgueres e salsichas tipo "hot-dog"), o leite cru, os vegetais (especialmente aqueles consumidos crus), os molhos preparados para saladas, a maionese e o suco de maçã. No geral, pode-se dizer que a carne bovina é uma das principais fontes potenciais de *E. coli* O157:H7, uma vez que o trato gastrointestinal de bovinos é o reservatório desses microrganismos (Knight, 1993). Dados levantados por Desmarchelier & Grau (1997) revelaram contaminação em zero a 3,7% das amostras de carne testadas em vários países do mundo e, segundo o USDA (1994), a contaminação (cruzada), se dá na hora do abate, se houver contato das vísceras com a carne e com a superfície dos equipamentos e utensílios da planta de processamento.

A carne bovina moída (hambúrguer), de maneira especial, tem sido o principal agente de surtos registrados nos Estados Unidos e outros países da Europa, presumindo-se que a operação de moagem transfira os microrganismos da superfície para todo o interior da massa de carne, aumentando assim a área de contato para o desenvolvimento bacteriano. Segundo Knight (1993),

pesquisas em supermercados americanos revelaram que *E. coli* O157:H7 está presente em um a 2,5% das amostras de carne testadas, embora exista a possibilidade de a contaminação ter ocorrido no próprio ponto de venda. O Programa de Monitoramento do FSIS/USDA (Food Safety and Inspection Service/United States Department of Agriculture) coletou, de 1994 a 2004, 80.620 amostras de produtos de carne bovina moída em fábricas e pontos de venda nos Estados Unidos, encontrando contaminação em 280 (0,35%) (FSIS/USDA, 2006).

Surtos associados com outros veículos além da carne, particularmente as frutas, os sucos de frutas, os vegetais e as saladas preparadas com vegetais também tem sido relatados. Nos Estados Unidos, de acordo com os dados do CDC (Center for Disease Control and Prevention) (Olsen *et al.*, 2000), os alimentos mais freqüentemente implicados em surtos provocados por cepas de *E. coli* enteropatogênica, no período de 1993 a 1997, foram a carne bovina (25%) e as frutas, vegetais e saladas (20%). A US Food and Drug Administration (FDA/CFSAN, 2001) acredita que dentre essas cepas enteropatogênicas, *E. coli* O157:H7 seja a mais freqüente.

No Brasil, o monitoramento realizado pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas, SP) (Silva *et al.*, 2003) analisou, no período de janeiro de 1997 a outubro de 1999, 2.095 amostras de alimentos, incluindo 1.111 de produtos cárneos, 115 do ambiente industrial e 869 de vegetais. Em nenhuma amostra foi detectada a presença de *E. coli* O157:H7. Essa amostragem é pequena, comparada com o volume de produção do país, mas os resultados indicam que a ocorrência no Brasil deve ser bem mais baixa do que em outros países, onde amostragens similares têm detectado a presença em 0,2 a 3,7% das amostras analisadas.

Taxonomia

E. coli é uma espécie da família *Enterobacteriaceae*, definida como bastonetes Gram negativos anaeróbios facultativos e oxidase negativos. As cepas do sorotipo O157:H7 apresentam a maioria das características típicas da espécie *E. coli*, que são, segundo o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Brenner *et al.* (2005): teste de indol positivo (98% das cepas), teste de VM positivo (99% das cepas), teste de VP negativo (100% das cepas), teste de citrato negativo (99% das cepas), teste de H_2S negativo (99% das cepas) e teste de urease negativo (99% das cepas).

O *Bergey's Manual* não relata os resultados dos testes bioquímicos separadamente para o sorotipo O157:H7, mas Ratnam *et al.* (1988) caracterizaram 174 cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de surtos e casos esporádicos de colite hemorrágica, HUS e diarréia não sanguinolenta, com os resultados apresentados no Quadro 17.1. As principais características que diferenciam esse sorotipo das demais cepas de *E. coli* são a incapacidade de fermentar o sorbitol e de produzir a enzima β-glicuronidase.

Segundo Brenner *et al.* 2005), 94% das cepas de *E. coli* são sorbitol positivas e, segundo Feng & Hartman (1982), 96% produzem β-glicuronidase. *E. coli* O 157:H7 é uma exceção, embora haja relatos de isolamento de variantes sorbitol e/ou β-glicuronidase positivas (Gunzer *et al.*, 1992, Hayes *et al.*, 1995).

Várias espécies de enterobactérias são capazes de reagir com o anti-soro O157 (reação cruzada), incluindo, segundo Silveira *et al.* (1999): *Enterobacter* sp (particularmente *E. cloacae*), *Klebsiella* sp (particularmente *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*), *Citrobacter* sp (particularmente *C. freundii*), *Serratia* sp (particularmente *S. rubidaea*), *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Kluyvera ascorbata*, *Escherichia hermannii* e *Escherichia fergusonii*. Dessas, *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *H. alvei* e *S. rubidaea* também são sorbitol negativas, assim como 40% das cepas de *K. ascorbata* e 30% das cepas de *P. agglomerans* (Brenner *et al.*, 2005). As características bioquímicas que permitem diferenciar essas espécies de *E. coli* O157:H7 estão descritas no Quadro 17.1. *E. hermannii* é a mais freqüentemente citada como causa de falsos presuntivos no isolamento de *E. coli* O157:H7 no Ágar MacConkey Sorbitol.

Quadro 17.1. Principais características bioquímicas de *E. coli* O157:H7 em comparação com as demais cepas de *E. coli* e com outras enterobactérias sorbitol negativas reativas com o anti-soro O157.

Característica	*E. coli* O157:H7[a]	*Escherichia coli*[b]	*Escherichia hermannii*[b]	*Escherichia fergusonii*[b]	*Hafnia alvei*[b]	*Kluyvera ascorbata*[b]	*Pantoea agglomerans*[b]	*Serratia rubidaea*[b]
β-glicuronidase	0	96[a]	-[a]	NR[c]	NR[c]	NR[c]	NR[c]	NR[c]
Sorbitol	0	94	0	0	0	40	30	1
Pigmento amarelo	0	0	98	0	0	0	75	0
Salicina	0	40	40	65	13	100	65	99
Esculina	0	35	40	46	7	99	60	94
Arginina	0	17	0	5	6	0	0	0
Adonitol	0	5	0	98	0	0	7	99
Inositol	0	1	0	0	0	0	15	20
Celobiose	0	2	97	96	15	100	55	94
Urease	0	1	0	0	4	0	20	2
Citrato	0	1	1	17	10	96	50	95
KCN	0	3	94	0	95	92	35	25
Sacarose	87	50	45	0	10	98	75	99
Glicose (ácido)	100	100	100	100	100	100	100	100
Glicose (gás)	98	95	97	95	98	93	20	30
Indol	100	98	99	98	0	92	21	0
Arabinose	100	99	100	98	95	100	95	100
Trehalose	100	98	100	96	95	100	97	100
Manitol	100	98	100	98	99	10	100	100
Lactose	100	95	45	0	5	98	40	100
Maltose	100	95	100	96	100	100	89	99
Rhamnose	100	80	97	92	97	100	85	1
Xilose	100	95	100	96	98	99	93	99
Lisina	100	90	6	95	100	97	0	55
Ornitina	100	65	100	100	98	100	0	0
Rafinose	100	50	40	0	2	98	30	99
Dulcitol	100	60	19	60	0	25	15	0

[a] Porcentagem de cepas positivas, dados relatados por Ratnam *et al.* (1988).
[b] Porcentagem de cepas positivas, dados relatados por Brenner *et al.* (2005), exceto quando especificada outra fonte.
[c] Não relatado.

Métodos de detecção

O método cultural da Food and Drug Administration apresenta cinco etapas (Feng & Weagant, 2002):

1º) enriquecimento seletivo no Caldo de Enriquecimento de *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC-EB), que é o Caldo Tripticase de Soja suplementado com 0,05mg/l de cefixima, 10mg/l de cefsulodina e 8mg/l de vancomicina.

2º) Plaqueamento diferencial no Ágar MacConkey Sorbitol Telurito Cefixima (TC-SMAC), que é o Ágar MacConkey Sorbitol suplementado com 2,5mg/l de telurito de potássio e 0,05mg/l de Cefixima. Essa etapa faz uma triagem inicial das cepas sorbitol negativas, consideradas presuntivas.

3º) Confirmação preliminar das colônias típicas obtidas no TC-SMAC, através do teste de indol, teste de produção da enzima β-glicuronidase e características de crescimento no Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB).

4º) Confirmação sorológica e bioquímica das culturas indol positivas, β-glicuronidase negativas e típicas de *E. coli* no L-EMB, através do teste sorológico somático O157, teste sorológico flagelar H7 e testes bioquímicos no "kit" API 20E (BioMérieux). A base de dados do API 20E não diferencia as cepas O157 das demais cepas de *E. coli*. No entanto, segundo Haldane *et al.* (1986), a combinação mais típica dessas cepas nos 21 primeiros testes da cartela de resultados (Figura 17.1) é "5144172" (91,9% das cepas), podendo também ocorrer as combinações "5144152" (cepas sacarose negativas, 2,7%) e "5144162" (cepas rhamnose negativas, 5,4%).

5º) Testes moleculares com sondas genéticas ou PCR (reação de polimerase em cadeia) para verificação da presença dos genes das shiga toxinas stx1 e stx2. Esses testes exigem laboratórios especializados. Para uma triagem inicial, há o "kit" de aglutinação passiva reversa em Látex (RPLA) da Oxoid, que detecta a produção das toxinas.

+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
1 ONPG	2 ADH	4 LDC	1 ODC	2 CIT	4 H_2S	1 URE	2 TDA	4 IND	1 VP	2 GEL	4 GLU	1 MAN	2 INO	4 SOR	1 RHA	2 SAC	4 MEL	1 AMY	2 ARA	4 OX
	5			1			4			4			1			7			2	

Figura 17.1. Características típicas das cepas de *E. coli* O157:H7 no "Kit"API 20E da BioMérieux (Haldane *et al.*, 1986).

ONPG = orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosídeo (atividade de β-galactosidase), ADH = atividade de arginina dehidrolase, LDC = atividade de lisina descarboxilase, ODC = atividade de ornitina descarboxilase, CIT = utilização de citrato, H_2S = produção de H_2S, URE = atividade de urease, TDA = atividade de triptofano deaminase, IND = produção de indol, VP = produção de acetoína (teste de VP), GEL = atividade de gelatinase, GLU = fermentação/oxidação da glicose, MAN = fermentação/oxidação do manitol, INO = fermentação/oxidação do inositol, SOR = fermentação/oxidação do sorbitol, RHA = fermentação/oxidação da rhamnose, SAC = fermentação/oxidação da sacarose, MEL = fermentação/oxidação da melibiose, AMY = fermentação/oxidação da amigdalina, ARA = fermentação/oxidação da arabinose, OX = atividade de citocromo oxidase. Os números que acompanham o teste são os pontos a serem atribuídos quando o resultado for positivo, para compor a combinação numérica.

Os métodos culturais foram bastante usados nas décadas de 80 e 90, mas gradativamente vêm sendo substituídos por métodos imunológicos ou moleculares. Esses métodos, na sua maioria, são "kits" analíticos com marca registrada, definidos pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) como: "sistemas contendo todos os componentes chave para a realização da análise de um ou mais microrganismos, em um ou mais tipos de alimentos, segundo um determinado método" (Andrews, 1997). A grande vantagem dos "kits" é que o material requerido nos ensaios (todo ou parte dele) é comercializado em conjunto, eliminando a preparação no laboratório.

Já foram oficializados pela AOAC para a análise de *E. coli* O157 os "kits" analíticos descritos no Quadro 17.2.

Quadro 17.2. "Kits" analíticos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a detecção de *E. coli* O157 em alimentos.

Analito	Fabricante	Nome do "kit	Validação	Aplicação
E. coli O157:H7	BioControl Systems, Inc.	VIP for EHEC	AOAC Official Method 996.09	Alimentos, ingredientes e amostras ambientais
E. coli O157:H7	BioControl Systems, Inc.	Assurance EHEC EIA	AOAC Official Method 996.10	Alimentos, ingredientes e amostras ambientais
E. coli O157:H7	BioControl Systems, Inc.	VIP for EHEC and Assurance EHEC EIA 8h enrichment	Extensão de escopo 996.09 e 996.10	Carne bovina crua e cozida
E. coli O157	Neogen Corporation	ISO-Grid + SD39 Agar	AOAC Official Method 997.11	Alimentos
E. coli O157	Neogen Corp.	REVEAL for *E. coli* O157 8h	AOAC Official Method 2000.13	Carne bovina, alface e outros alimentos
E. coli O157	Neogen Corp.	REVEAL for *E. coli* O157 20h	AOAC Official Method 2000.14	Carne bovina, alface, cidra de maçã, outros alimentos e amostras ambientais
E. coli O157:H7	BioControl Systems, Inc.	Assurance GDS for *E. coli* O157:H7	AOAC Official Method 2005.04	Alguns alimentos
E. coli O157:H7	BioControl Systems, Inc.	Assurance GDS for Shigatoxin Genes	AOAC Official Method 2005.05	Alguns alimentos

Fontes:
AOAC, 2005. **Method news.** Disponível no site <http://aoac.org/vmeth/OMA_TestKits_List.pdf>, acesso em 14/03/06.
AOAC International, 2005. Rapid Test Kits. Disponível no site <http://www.aoac.org/testkits/kits-microbiology.htm>, acesso em 10/02/06.

17.2. MÉTODO BAM/FDA

Método da US Food and Drug Administration (FDA), descrito no Capítulo 4A do *Bacteriologycal Analytical Manual (BAM) Online* (Feng & Weagant, 2002)

17.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Caldo de Enriquecimento para *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC-EB)
- Placas de Ágar MacConkey Sorbitol Telurito Cefixima (TC-SMAC)
- Placas de Ágar Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE)
- Placas de Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB)
- Reagente de Kovacs para teste de indol
- Discos de Coli Complete (BioControl Systems, Inc)
- Anti-soro somático O157 ou "kits" de aglutinação em látex
- Anti-soro flagelar H7 ou "kits" de aglutinação em látex
- "Kit" API 20E (BioMérieux)
- "Shaker" incubador a 37±0,5°C com agitação e termômetro calibrado
- Estufa incubadora a 36±1°C e termômetro calibrado

17.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise para a detecção de *E. coli* O157:H7 pelo método BAM/FDA encontra-se descrito na Figura 17.2.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos nos testes de presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

Cuidado. A análise de *E. coli* O157:H7 deve ser conduzida por pessoal bem treinado, para garantir a segurança do analista e do laboratório. Durante a realização das análises, recomendam-se os seguintes cuidados: 1) que todo o manuseio das amostras e meios de cultura seja feito sobre bandejas e não diretamente sobre as bancadas, 2) que nenhuma coleta de líquido seja feita com a boca e sim com pipetadores, 3) que ao trabalhar em capela de fluxo laminar se utilize um modelo vertical, adequado ao manuseio de patógenos, 4) que se mantenha ao alcance das mãos um frasco de desinfetante como solução de cloro a 100ppm ou solução de álcool iodado, para descontaminar qualquer descarga inadvertida de material contaminado, 5) que todo o descarte de material seja precedido da descontaminação em autoclave a 121ºC/30min, 6) que toda a área de trabalho seja prontamente descontaminada, uma vez concluídas as análises, 7) que no preparo e homogeneização das amostras se tomem precauções para evitar a formação de aerossóis. Para tanto, recomenda-se que a homogeneização seja feita preferencialmente em "stomacher" e que, na homogeneização em liquidificador, a tampa seja protegida por papel amarrado com barbante, aguardando-se a acomodação do material homogeneizado, antes da abertura do frasco.

a) Enriquecimento

Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar 25g ou ml da amostra em 225ml de Caldo de Enriquecimento para *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC-EB). Incubar a 37±0,5ºC/24h com agitação.

b) Plaqueamento seletivo diferencial

Agitar delicadamente os frascos de caldo EHEC-EB e estriar uma alçada de cada cultura (estrias de esgotamento) em uma placa de Ágar MacConkey Sorbitol Telurito Cefixima (TC-SMAC). Em outra placa de TC-SMAC, plaquear (plaqueamento em superfície) 0,1ml de cada cultura em EHEC-EB, fazendo diluições se houver suspeita de uma população alta de *E. coli* O157:H7. Incubar as placas a 36±1ºC/18-24h. Depois da incubação, pelo menos uma das placas deve conter colônias isoladas para confirmação.

c) Confirmação preliminar

Selecionar cinco colônias típicas para a confirmação preliminar. No Ágar TC-SMAC as colônias de *E. coli* O157 são incolores ou acinzentadas, com centro esfumaçado e 1-2mm de diâmetro. Estriar cada colônia (estrias de esgotamento) em uma placa de Ágar Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE) e incubar a 36ºC/18-24h. Selecionar as colônias bem isoladas em TSA para os testes de indol, crescimento em L-EMB e produção de β-glicuronidase.

c.1) Teste de indol. Colocar uma folha de papel de filtro em uma placa de Petri e umedecer com o reagente de Kovacs para teste de indol. Com uma alça de inoculação, remover uma pequena quantidade da cultura e espalhar sobre o reagente no papel, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor vermelho violeta (teste positivo) ou não (teste negativo). *E. coli* O157 é indol positiva, podendo ser descartadas todas as culturas negativas.

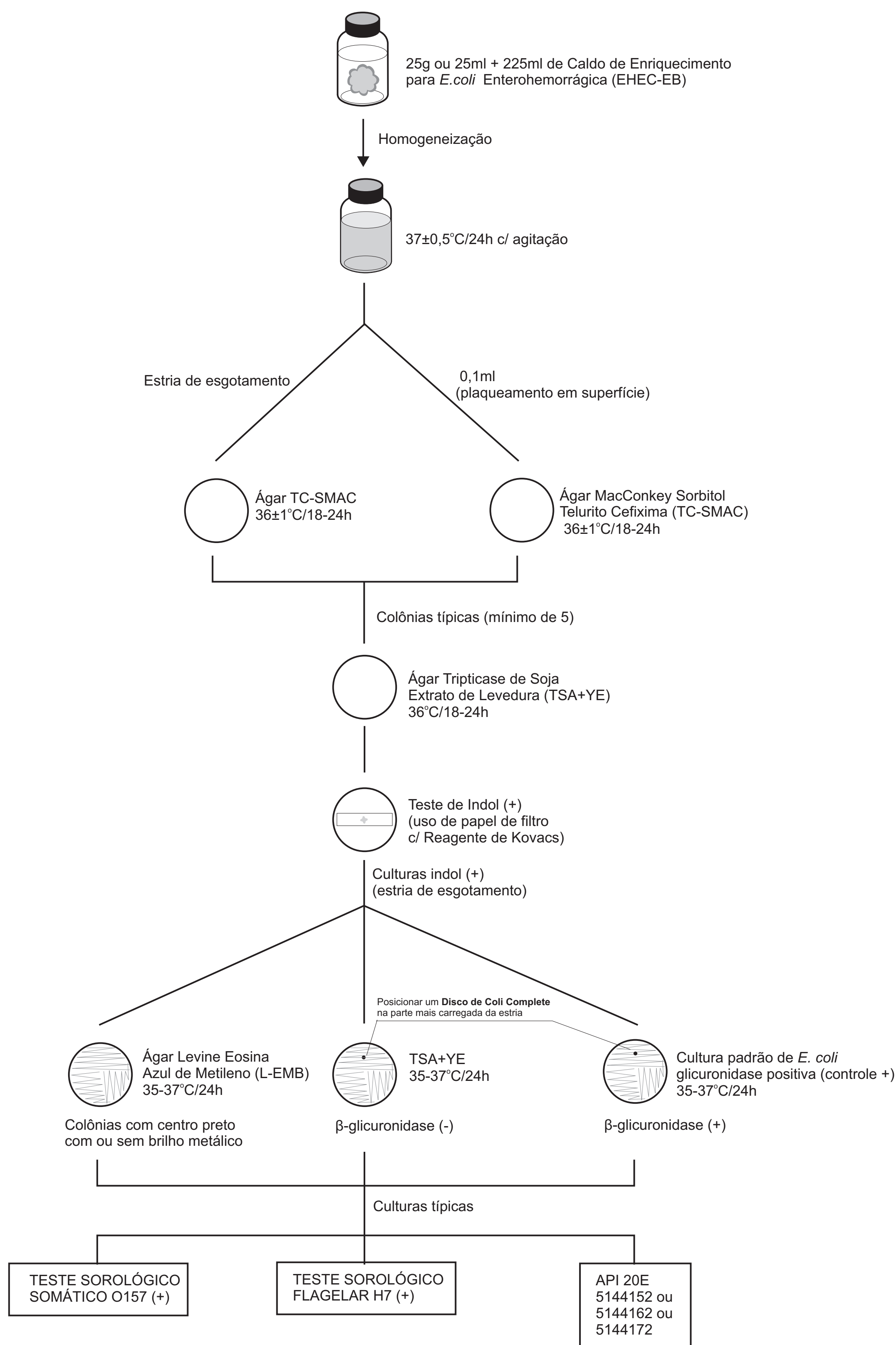


Figura 17.2 Esquema de análise para a detecção de *E. coli* O157:H7 pelo método Food and Drug Administration (FDA), descrito no *Bacteriologycal Analytical Manual* (Feng & Weagant, 2002).

c.2) Teste de crescimento em L-EMB e produção de β-glicuronidase. A partir de cada cultura indol positiva em TSA-YE, estriar (estrias de esgotamento) uma alçada em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB) e em uma alçada em uma nova placa de TSA-YE. No primeiro quadrante das estrias em TSA-YE (parte mais carregada de inóculo), colocar um disco de Coli Complete (BioControl Systems, Inc), que contém MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo), substrato para a enzima β-glicuronidase. Preparar uma placa de TSA-YE da mesma forma, usando uma cultura padrão de *E. coli* glicuronidase positiva (controle positivo). Incubar todas as placas por uma noite a 35-37°C e observar se as culturas apresentam características típicas no par de placas. Em L-EMB *E. coli* O157 apresenta colônias com centro preto, com ou sem brilho metálico. Na placa de TSA-YE com o disco de Coli Complete, observada sob luz ultravioleta (ondas longas, 365nm), não apresenta fluorescência azulada em redor do disco (β-glicuronidase negativa), enquanto a cepa padrão positiva sim. Descartar as culturas β-glicuronidase positivas.

d) Confirmação definitiva

Para a confirmação definitiva são usados o teste sorológico somático O157, o teste sorológico flagelar H7 e os testes bioquímicos do "kit" API 20E (BioMérieux).

d.1) Teste sorológico somático O157. A confirmação do grupo sorológico O157 é feita pelo teste padrão de aglutinação em lâmina, da mesma forma descrita no método BAM/FDA para *Salmonella*, com o antisoro O157. Pode também ser feito utilizando-se "kits" de aglutinação em látex, disponíveis comercialmente, seguindo a orientação do fabricante. Para o teste sorológico somático é importante preparar a suspensão a partir de uma única colônia do microrganismo, porque inóculos pesados podem resultar em falsos resultados positivos (autoaglutinação). Alguns "kits" exigem a confirmação dos resultados positivos, repetindo-se o ensaio com o reagente controle, para eliminar casos de autoaglutinação. Alguns "kits" já incluem o antisoro H7, permitindo os dois testes sorológicos.

d.2) Teste sorológico flagelar H7. Apenas as culturas positivas no teste sorológico somático O157 devem ser submetidas ao sorológico flagelar. O procedimento mais comum é a utilização de "kits" de aglutinação em látex, cujo princípio é o mesmo do O157, substituindo-se o antissoro. Para a realização do teste, devem ser seguidas as orientações do fabricante.

d.3) Confirmação bioquímica com o "kit" API 20E. O teste deve ser feito seguindo as orientações do fabricante. A combinação mais típica de *E. coli* O157:H7 nos 21 primeiros testes da cartela de resultados é "5144172" (91,9% das cepas), podendo também ocorrer as combinações "5144152" (cepas sacarose negativas) e "5144162" (cepas rhamnose negativas).

d.4) Presença dos genes das shiga toxinas stx1 e stx2. Enviar a um laboratório apto à realização de testes moleculares com sondas genéticas ou PCR (reação de polimerase em cadeia). Para uma triagem inicial pode ser utilizado o "kit" de aglutinação passiva reversa em Látex (RPLA) da Oxoid ou similar, seguindo a orientação do fabricante. Esse "kit" detecta a produção das toxinas.

17.3. REFERÊNCIAS

ANDREWS, W.H., 1997. New trends in food microbiology: an AOAC International perspective. **Journal of AOAC International 80(4)**:908-912.

AOAC, 2005**. Method news.** Disponível no site <http://aoac.org/vmeth/OMA_TestKits_List.pdf>, acesso em 14/03/06.

AOAC International, 2005. **Rapid Test Kits**. Disponível no site <http://www.aoac.org/testkits/kits-microbiology.htm>, acesso em 10/02/06.

BEUTIN, L., ZIMMERMAN, S., GEIER, K., 1998. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emerging Infectious Diseases 4**:635-639.

BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005.

CANTARELLI, V., NAGAYAMA, K., TAKAHASHI, A. *et al.*, 2000. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology 31**:266-270.

CDC (Center for Disease Control and Prevention), 1993. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States,1992-1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report 42**:258-263.

CERQUEIRA, A. M. F., GUTH, B. E. C., JOAQUIM, R. M., ANDRADE, J. R. C., 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle at Rio de Janeiro State, Brazil**. Veterinary Microbiology, 70**:111-121.

CERQUEIRA, A.M. F., TIBANA, A., GUTH, B. E. C., 1997. High occurrence of Shiga-like-toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **Journal of Food Protection 60**:1-5.

DESMARCHELIER, P. M.; GRAU, F. H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JNSON, I. *et al.*(Ed.). **Foodborne microrganisms of public health significance.** Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap. 7, p. 231-264.

EDUARDO, M. B., MELLO, M. L. R., KATSUYA, E. M. *et al.*, 2002. **Síndrome Hemolítico-Hurêmica – Normas e Instruções**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/shu.pdf>. Acesso em 21/03/06.

FDA/CFSAN, 2001. *Escherichia coli* O157:H7. In: **Foodborne Pathogenic Microrganisms and Natural Toxins Handbook (The "Bad Bug Book")**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Cap. 15. Disponível em: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/badbug.zip>. Acesso em 20/03/06.

FENG, P.C.S. & HARTMAN, P.A., 1982. Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Eschericihia coli*. **Applied and Environmental Microbiology 43**:1320-1329**.**

FENG, P. & WEAGANT, S.D., 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: **Bacteriological Analytical Manual Online** (disponível no site: http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html), U.S. Food & Drug Administration (FDA), Center for Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN). Capítulo 4A, revisão de setembro de 2002, acesso em 02/02/06.

FSIS/USDA, 2006. **Raw Ground Beef Products Analyzed for *E. coli* O157:H7.** United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/science/2006_Ecoli_Positive_Results/index.asp>. Acesso em: 21/03/2006.

GRIFFIN, P. M. & TAUXE, R.V., 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorragic *E. coli* and the associated Hemolytic Uremic Syndrome. **Epidemiologic Reviews 13**:60-98.

GUNZER, F., BÖHM, H., RÜSSMANN, H. *et al.*, 1992. Molecular detection of sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology 30:**1807-1810.

GUTH, B. E. C., RAMOS, S. R. T. S., CERQUEIRA, A. M. F. *et al.*, 2002a. Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Osvaldo Cruz On Line 97(8)**:1085-1089. Disponível em <http://memorias.ioc.fiocruz.br/978/4607.html>. Acesso em 21/03/2006.

GUTH, B. E. C., LOPES, R., VAZ, T. M. I., IRINO, K., 2002b. First shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome in Brazil. **Emerging Infectious Diseases 8**:535-536.

HALDANE, D. J. M., DAMM, M. A. S., ANDERSON, J. M., 1986. Improved biochemical screening procedure for small clinical laboratories for vero (shiga-like) toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology 24**:652-653.

HAYES, P.S., BLOM, K., FENG, P. *et al.*, 1995. Isolation and characterization of β-glucuronidase-producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States. **Journal of Clinical Microbiology 33:**3347-3348.

HUPPERTZ, H. I., BUSCH D., SCHMIDT, H. *et al.*, 1996. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. **The Journal of Pediatrics 128**:341-346.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. **Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN0-306-47262-7).

IRINO, K., GOMES, T.A.T., VAZ, T.M.I. *et al.*, 2000. Prevalence of Shiga toxin and intimin gene sequences among *Escherichia coli* of serogroups O26, O55, O111, O119 and O157 isolated in São Paulo, Brazil. The 4th International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, 2000, Kyoto, Japan. **Anais**. p. 107.

IRINO, K., VAZ, T. M. I., KATO, M. A. M. F. *et al.*, 2002. O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil **Emerging Infectious Diseases 8**:446-447.

KNIGHT, P., 1993. Hemorragic *Escherichia coli:* the danger increases. **American Society for Microbiology News 59(5)**:247-250.

LIOR, H., 1994. *Escherichia coli* O157:H7 and verocitoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Dairy, Food and Environmental Sanitation 14(7)**:378-382.

MEDLINEPLUS, 2006. **Enciclopedia Médica en Español**. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/encyclopedia.html, acesso em 21/03/06.

MENG, J., DOYLE, M. P., ZHAO, T. *et al.*, 1994. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science and Technology 51**:179-184.

NATARO, J. P., KAPER, J. B., 1998. Diarreagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews 11**:142-201.

OLSEN, S. J., MacKINON, L. C., GOULDING, J. S. *et al.*, 2000. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report 49(SS01)**:1-51.

PATON, J. C., PATON, A. W., 1998. Patogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews 11**:450-479.

PIÉRARD, D., STEVENS, D., MORIAU, L. *et al.*, 1997. Isolation and virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in human stool samples. **Clinical Microbiology and Infection 3**:531-539.

RATNAM, S., MARCH, S.B., AHMED R. *et al.*, 1988. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. **Journal of Clinical Microbiology 26(10):**2006-2012.

ROCHA, H. H. A. G., 2003. Diagnóstico diferencial das principais causas de sangramento em uma unidade de emergência - visão clínica e laboratorial. **LAES & HAES** Edição 142.

SANDERSON, M. W., GAY, J. M., HANCOCK, D. D. *et al.*, 1995. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology 33**:2616-2619.

SILVA, N., SILVEIRA, N.F.A., OKAZAKI, M.M., 2003. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **REV NET-DTA 8**:129-134. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/revnet/revnet_n803.htm>, acesso em 20/03/2006.

SILVEIRA, N.F., SILVA, N., CONTRERAS, C. *et al.*, 1999. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers produced in Brasil. **Journal of Food Protection 62(11)**:133-1335.

TARR, P. I., NEILL, M. A, 1996. Perspective: The problem of non-O157:H7 Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases 174**:1136-1139.

USDA (United States Department of Agriculture), 1994. ***Escherichia coli* O157:H7**: issues and ramifications. Colorado: Center for Epidemiology and Animal Health, 48p.

WEAGANT, S. D., BRYANT, J. L., JINNEMN, K. G., 1995. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Journal of Food Protection 58(1)**:7-12.

WHO, 1997. Prevention and control of enterohaemorragic *Escherichia coli* (EHEC) infections. **WHO/FSF/FOS/97.6**, World Health Organization

WHO, 1998. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). **WHO/CSR/APH/98.8,** Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. Berlin, Germany, 23-26 June 1998. Disponível em < http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_CSR_APH_98.8.pdf >. Acesso em 21/03/2006.

Capítulo 18

Listeria monocytogenes

18.1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria patogênica para o homem e outros animais, provocando doenças graves como encefalite, septicemia e aborto em bovinos, ovinos, caprinos e humanos. De acordo com as informações de Ryser & Donnelly (2001), é encontrada em vários tipos de mamíferos, aves, peixes, anfíbios e insetos, na maioria dos casos portadores assintomáticos que liberam a bactéria nas fezes, sem desenvolver infecções. O reservatório primário parece ser o solo e a vegetação, mas é amplamente distribuída no ambiente, encontrada no solo, água, fezes, esgotos, plantas em decomposição e silagem. Já foi bem documentado o envolvimento da silagem na transmissão de *L. monocytogenes* para ovinos, caprinos e bovinos, que ocorre quando a silagem é fermentada inadequadamente ou apresenta crescimento visível de fungos, mantendo pH maior do que 5,0. Também já foi bem estabelecida a relação entre a ingestão de silagem contaminada e a mastite em bovinos, com a subsequente contaminação do leite destinado ao consumo humano.

Taxonomia

Os membros do gênero *Listeria* são definidos como pequenos bastonetes Gram positivos não esporogênicos, catalase positivos e não produtores de H_2S. Crescem numa ampla faixa de temperatura (1 a 45°C), com ótimo entre 30-37°C. São classificados como psicrotolerantes, em função da capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (Holt *et al.*, 1994, Ryser & Donnelly, 2001).

O gênero é constituído por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua*, *L. grayi* e *L. welshimeri*) (DSMZ, 2010), cujas características encontram-se descritas no Quadro 18.1.

As listerias são imóveis quando crescem a 35°C mas apresentam motilidade característica a 25°C, com movimentos rotatórios ou de tombamento, em montagens úmidas observadas sob imersão. Em meios de motilidade como o Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM), desenvolvem uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restritas à picada no fundo do tubo. Esse tipo de migração produz uma massa de crescimento característica, lembrando um guarda-chuva. Em meios de cultura de cor clara (creme ou bege) produzem colônias que, observadas sob luz obliqua, apresentam uma coloração levemente azulada e iridescente. São oxidase negativas, anaeróbias facultativas, fermentam a glicose (e outros carboidratos) com produção de ácido mas sem produção de gás, hidrolizam a esculina e o hipurato de sódio (Ryser & Donnelly, 2001).

As espécies são diferenciadas principalmente através da fermentação de carboidratos (xilose, rhamnose, manitol e α-metil-D-manosídeo) e da produção de hemolisina, verificada no teste de β-hemólise e no teste CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson Test).

Quadro 18.1. Principais características das espécies de *Listeria* (Ryser & Donnelly, 2001, Holt *et al.*, 1994)

Característica	*L.monocytogenes*	*L.seeligeri*	*L.ivanovii*	*L.innocua*	*L.grayi*	*L.welshmeri*
Motilidade tipo guarda chuva	+	+	+	+	+	+
Motilidade rotacional	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-		-	-	-
Crescimento em TSI[a]	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Crescimento em presença de bile e hidrólise da esculina	+	+	+	+	+	+
OF Glicose[b]	OF	OF	OF	OF	OF	OF
Redução nitrato	-	-	-	-	-	ND*
β-hemólise	+	+	+	-	-	-
CAMP – *S. aureus*	+	+	-	-	-	-
CAMP – *R. equii*	-	-	+	-	-	-
Ácido a partir de manitol	-	-	-	-	+	-
Ácido a partir de D-xilose	-	+	+	-	-	+
Ácido a partir de L-rhamnose	+	-	-	+/-	-	+/-
Ácido a partir de α-metil-D-manosídeo	+	-	-	+	ND*	+

* ND = Não determinado. [a]A/A = Rampa ácida/Fundo ácido. [b]OF = Oxidativo e Fermentativo

Patogenicidade

Dentre as espécies de *Listeria, L. monocytogenes* é inquestionavelmente patogênica para o homem. As características da doença, forma de transmissão, alimentos envolvidos e outras informações apresentadas abaixo são do *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos,* do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo (Informe-Net DTA, 2003).

Listeriose é a denominação de um grupo geral de desordens causadas por *L. monocytogenes,* que incluem septicemia, meningite (ou meningoencefalite), encefalite e infecção cervical ou intra-uterina em gestantes, que podem provocar aborto (no segundo ou terceiro trimestre) ou nascimento prematuro. Outros danos podem ocorrer, como endocardite, lesões granulomatosas no fígado e outros órgãos, abscessos internos ou externos e lesão cutânea papular ou pustular. Essas desordens são comumente precedidas por sintomas semelhantes ao da gripe, com febre persistente. Sintomas gastrointestinais como náusea, vômitos e diarréia podem preceder ou acompanhar as manifestações mais graves da doença. A taxa de letalidade em recém-nascidos é de 30%; em adultos (sem gravidez) é de 35% (em torno de 11% para menores de 40 anos e de 63% para maiores de 60 anos). Quando ocorre septicemia, a taxa de letalidade é de 50% e, com meningite, pode chegar a 70%.

Os principais grupos suscetíveis são mulheres grávidas e fetos (infecção neonatal e perinatal), indivíduos imunossuprimidos devido à utilização de medicamentos (corticosteróides, drogas para câncer e para transplantados), pacientes com leucemia, câncer e AIDS, diabéticos, cirróticos, asmáticos, indivíduos com colite ulcerativa, idosos e indivíduos fazendo uso de antiácidos ou cimetidina. Há alguma evidência de que a doença confira imunidade.

A dose infectiva é desconhecida, mas, acredita-se variar conforme a cepa e a susceptibilidade do indivíduo atingido. Em casos contraídos através de leite pasteurizado ou cru, afirma-se que, em grupos de risco, menos de 1.000 organismos podem causar a doença. O período de incubação é variável, havendo casos de surtos com períodos que vão de três a 70 dias após a exposição ao produto contaminado. O período mediano de incubação é estimado em três semanas.

A ocorrência no Brasil é subdiagnosticada e subnotificada e as infecções assintomáticas provavelmente ocorrem em todas a idades, embora, sejam de importância apenas na gravidez. Trata-se de infecção usualmente não diagnosticada, com uma incidência de 4,5 casos hospitalizados por um milhão de habitantes (dados dos E.U.A.).

Alguns estudos sugerem que 1-10% dos humanos são portadores assintomáticos de *L. monocytogenes* no intestino, encontrada também em pelo menos 37 espécies de mamíferos (domésticos e selvagens), 17 espécies de pássaros e em algumas espécies de peixes e frutos do mar. Infecções em raposas provocam uma encefalite que simula a raiva.

O modo de transmissão nos surtos registrados se mostraram associados à ingestão de leite contaminado (cru ou pasteurizado de fontes não seguras), queijos, sorvetes, água, vegetais crus, patês de carnes, molhos de carne crua fermentada, aves cruas ou cozidas, peixes (inclusive defumados) e frutos do mar. Queijos em processo de maturação podem constituir meio para o crescimento de *Listeria* e são causas freqüentes de surtos. Lesões nas mãos e nos braços podem ocorrer por contato direto com material infeccioso. Em infecções neonatais, o microrganismo pode ser transmitido da mãe para o feto, no útero ou no canal do parto.

Métodos de análise

Os métodos de detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos utilizam principalmente a capacidade de crescer em baixas temperaturas e a resistência a vários antibióticos, como características seletivas de isolamento. A técnica de enriquecimento a frio em meios não-seletivos foi inicialmente bastante usada, porém, em função do longo tempo de refrigeração requerido, foi substituída pelo enriquecimento em meios seletivos. Esses meios geralmente são caldos nutritivos suplementados com vários agentes antimicrobianos, sendo mais utilizados o ácido nalidíxico, a acriflavina e a cicloeximida.

Um grande número de métodos de detecção de *L. monocytogenes* em alimentos foram desenvolvido, nos últimos anos, sendo mais amplamente difundidos e utilizados o método do *Bacteriological Analitycal Manual (BAM)* da Food and Drug Administration (FDA) (Hitchins, 2003) e o método do *Microbiology Laboratory Guidebook (MLG)* do United States Department of Agriculture (USDA/FSIS, 2005). No Quadro 18.2 encontram-se sumarizadas as etapas de subcultura, meios utilizados e condições de incubação recomendados nesses métodos.

Em 2004 a ISO (International Standards Organization) editou emendas aos métodos ISO 11290-1:1996 e 11290-2:1998, adotando o Ágar *Listeria* de Ottaviani & Agosti (ALOA) para a detecção ou contagem de *L. monocytogenes*. Na contagem, o método inclui uma etapa de recuperação para células injuriadas, em que a amostra permanece por uma hora a 20ºC em condições não seletivas. Depois disso, são preparadas diluições para a inoculação nas placas de ALOA.

O ALOA contém uma mistura de agentes seletivos que objetivam inibir bactérias Gram negativas e Gram positivas (ácido nalidíxico, ceftazidina, polimixina), bem como bolores e leveduras (cicloeximida ou anfotericina). Dois agentes diferenciais foram incorporados. Um é o X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicopiranisídeo), substrato cromogênico para a enzima β-glicosidase de *Listeria*, cujo produto de reação confere às colônias uma coloração verde azulada. O outro é o fosfatidilinositol, para detectar a atividade da enzima fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC), reconhecida como um fator de virulência de *L. monocytogenes*. No meio de cultura, a atividade dessa enzima provoca a formação de um halo opaco em redor das colônias. *L. ivanovii* também produz fosfatidilinositol fosfolipase, desenvolvendo colônias similares no ALOA, porém, seu crescimento é retardado nesse meio. *L. innocua* cresce bem no ALOA, mas não forma o halo de fosfolipase, enquanto *L. seeligeri* é inibida.

Outros métodos que já foram oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) são os "kits" analíticos descritos no Quadro 18.3.

Quadro 18.2. Etapas de subcultura, condições de incubação e meios de cultura utilizados na análise de *Listeria monocytogenes* em alimentos pelos métodos da FDA, USDA e ISO.

Método[a]	Primeiro enriquecimento[b]	Segundo enriquecimento[b]	Plaqueamento diferencial[b]
BAM/FDA (2003)	BLEB sem os agentes seletivos a 30ºC/4h	BLEB com os agentes seletivos completando 48h a 30ºC	OXA[c] a 35ºC/24-48h
MLG/FSIS/USDA (2009)	UVM a 30±2ºC/22±2h	Caldo Fraser a 35±2ºC/26-48±2h ou MOPS-BLEB a 35±2ºC/18-24h	MOX a 30±2ºC/22±2h
ISO 11290-1:1996 amendment 1:2004	Half-Fraser a 30±1ºC/24h	Caldo Fraser a 35±1ºC/48h ou 37±1º/48h	ALOA a 37±1ºC/24±3h ou 48±6h 2º Opcional[d]
ISO 11290-2:1998 amendment 1:2004	BPW ou Half-Fraser a 20±2ºC/1h±5min	Não tem	ALOA a 37±1ºC/24±3h ou 48±6h (Plaqueamento em superfície de diluições para contagem)

[a] BAM/FDA = *Bacteriological Analitycal Manual*/Food and Drug Administration (Hitchins, 2003), MLG/FSIS/USDA = *Microbiology Laboratory Guidebook*/Food Safety and Inspection Service/United States Department of Agriculture (USDA/FSIS, 2009), ISO = International Standards Organization.

[b] **ALOA** = Ágar Listeria Ottaviani & Agosti, **BLEB** = Caldo de Enriquecimento de *Listeria* Tamponado, **BPW** = Água Peptonada Tamponada, **Half-Fraser** = Caldo Fraser com apenas metade da concentração dos agentes seletivos ácido nalidíxico e acriflavina HCl, **MOPS-BLEB** = Caldo de Enriquecimento de *Listeria* Tamponado com Ácido Morpholinopropanosulfonico (MOPS), **MOX** = Ágar Oxford Modificado, **OXA** = Ágar Oxford, **Palcam** = Palcam *Listeria* Selective Agar, **UVM** = Caldo Universidade de Vermont.

[c] Podem ser utilizados outros meios de cultura para o plaqueamento seletivo diferencial, sendo recomendados, em ordem de preferência: Palcam Listeria Selective Agar, 35ºC/24-48h, Ágar Oxford Modificado (MOX), 35ºC/24-48h e Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactan suplementado com esculina e Fe^{3+} (LPM), 30ºC/24-48h.

[d] O segundo meio é de livre escolha do laboratório, complementar ao ALOA, como o OXA ou Palcam (incubação conforme orientação do fabricante).

Cuidados especiais na realização das análises

A análise de *L. monocytogenes* deve ser conduzida por pessoal bem treinado, para garantir a segurança do analista e do laboratório. Nenhum indivíduo que faça parte dos grupos de risco, mesmo treinado, deve ser autorizado a realizar essas análises ou a entrar no laboratório durante a sua realização. Os principais grupos de risco são mulheres grávidas (e seus fetos) e indivíduos com o sistema imunológico temporária ou definitivamente comprometido. Para esses indivíduos, a taxa de mortalidade por listeriose é alta.

Quadro 18.3. “Kits” analíticos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

Analito	Fabricante	Nome do “kit”	Validação AOAC	Aplicação
Listeria spp.	Neogen Corporation	GENE TRAK *Listeria* Assay	AOAC Official Method 993.09	alimentos
Listeria spp.	Organon Teknika	*Listeria*-Tek	AOAC Official Method 994.03	alimentos e amostras ambientais
Listeria spp.	TECRA Diagnostics	TECRA *Listeria* VIA	AOAC Official Methods 995.22, 2002.09	alimentos e relacionados, amostras ambientais
Listeria spp.	BioControl Systems, Inc.	Assurance *Listeria* EIA	AOAC Official Method 996.14	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Listeria spp.	BioControl Systems, Inc.	VIP for *Listeria*	AOAC Official Method 997.03	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Listeria spp.	BioMerieux	VIDAS *Listeria* (LIS)	AOAC Official Methods 999.06, 2004.06	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Listeria monocytogenes	Dupont/Qualic on	Bax PCR Automated System for *L.monocytogenes*	AOAC Official Method 2003.12	alimentos
Listeria monocytogenes	BioMerieux	VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2) Immunoassay	AOAC Official Method 2004.02	alimentos
Listeria spp.	BioMerieux	VIDAS *Listeria* (LIS) Immunoassay using Demi-Fraser and Fraser Broths	AOAC Official Method 2004.06	alimentos

Fontes: AOAC, 2009. Rapid Methods Adopted as AOAC Official Methods. Disponível no site <http://www.aoac.org/vmeth/oma_testkits.pdf>, acesso em 28/08/09.

No tratamento das amostras para a análise de alimentos refrigerados, são recomendados alguns cuidados: 1) Na análise quantitativa, é importante que as amostras sejam analisadas o mais rápido possível, porque *L. monocytogenes* cresce nessas temperaturas, podendo ocorrer uma elevação na quantidade originalmente presente. 2) Não é recomendado o congelamento dessas amostras porque, embora *L. monocytogenes* seja relativamente resistente ao congelamento, pode ocorrer redução em alguns alimentos. 3) O crescimento de *L. monocytogenes* não é uniforme nesses produtos, devendo-se tomar a unidade analítica nas regiões onde o crescimento é concentrado. Em queijos a região de concentração é a parte interna mais próxima da superfície. Nas carnes embaladas à vácuo é concentrado na superfície ou próximo da superfície em contato com o filme. 4) O crescimento de *L. monocytogenes* nesses alimentos também tende a ser errático ou pontual, concentrando-se em algumas porções de um lote e em outras não. Assim, a amostragem de lotes no varejo deve contemplar um número grande de unidades de amostra, para uma avaliação mais precisa da extensão da contaminação.

Durante a realização das análises, recomendam-se os seguintes cuidados: 1) que todo o manuseio das amostras e meios de cultura seja feito sobre bandejas e não diretamente sobre as bancadas, 2) que nenhuma coleta de líquido seja feita com a boca e sim com pipetadores, 3) que ao trabalhar em capela de fluxo laminar se utilize um modelo vertical, adequado ao manuseio de patógenos, 4) que se mantenha ao alcance das mãos um frasco de desinfetante como solução de cloro a 100ppm, solução de álcool 70% ou solução de álcool iodado, para descontaminar qualquer descarga inadvertida de material contaminado, 5) que todo o descarte de material seja precedido da descontaminação em autoclave a 121°C/30min, 6) que toda a área de trabalho seja prontamente descontaminada, uma vez concluídas as análises, 7) que no preparo e homogeneização das amostras se tomem precauções para evitar a formação de aerossóis. Para tanto, recomenda-se

que a homogeneização seja feita preferencialmente em "stomacher" e que, na homogeneização em liquidificador, a tampa seja protegida por papel amarrado com barbante, aguardando-se a acomodação do material homogeneizado, antes da abertura do frasco.

18.2. MÉTODO BAM/FDA

Método da US Food and Drug Administration (FDA), descrito no Capítulo 10 do *Bacteriological Analitycal Manual (BAM) Online* (Hitchins, 2003). Aplicação: todos os alimentos.

18.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Caldo Enriquecimento para *Listeria* Tamponado (BLEB)
- Placas de Agar Oxford (OXA)
- Tubos de Ágar Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE) inclinados
- Tubos de Caldo Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSB-YE)
- Tubos de Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM)
- Reagente para teste de catalase (peróxido de hidrogênio a 3%)
- Reagentes para coloração de Gram
- Sistema comercial de identificação como o API *Listeria* (BioMeriéux) ou MICRO-ID™ (BioMeriéux) ou MicroArray for *Listeria* (Biolog) ou o Vitek Automicrobic Gram Positive and Gram Negative Identification Cards (BioMeriéux)

Material para provas bioquímicas (opcional na indisponibilidade de "kits" comerciais)

- Placas de Ágar Sangue Nº 02
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% dextrose
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% maltose
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% esculina
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% xilose
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% rhamnose
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% manitol
- Tubos de Caldo Nitrato
- Reagentes para teste de nitrato (Solução 0,8% de ácido sufanílico, Solução 0,5% de alfa-naftol)
- Cultura de *Staphylococcus aureus* beta-hemolítico (ATCC 49444, ATCC 25923, NCTC 7428 ou CIP 5710) (vide nota 18.2.2.c.7.1)
- Cultura de *Rhodococcus equii* (ATCC 6939 ou NCTC 1621)
- Estufa incubadora a 30ºC (não especificada a variação de temperatura aceitável no método da FDA)
- Estufa incubadora a 35ºC (não especificada a variação de temperatura aceitável no método da FDA)

18.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise para a detecção de *L. monocytogenes* pelo método da US Food and Drug Administration (FDA) encontra-se descrito na Figura 18.1.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos nos testes de presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

Cuidado. Ler atentamente as recomendações da introdução do capítulo, item 18.1, subitem "cuidados especiais na realização das análises", para familiarizar-se com as medidas necessária à segurança do analista e do laboratório.

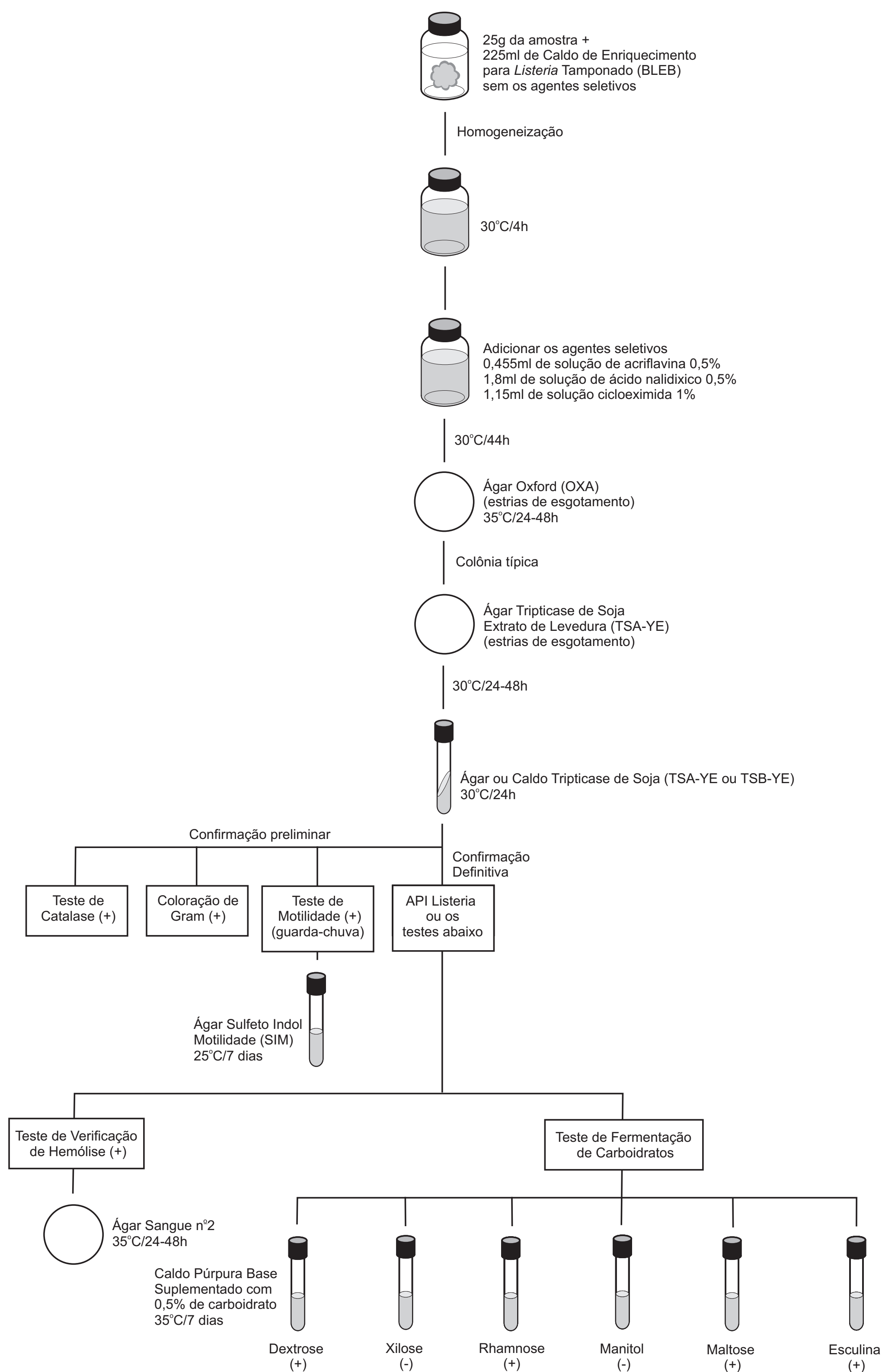


Figura 18.1. Esquema de análise para a detecção de *L. monocytogenes* pelo método da US Food and Drug Administration (FDA) descrito no *Bacteriological Analitycal Manual* (Hitchins, 2003).

a) Pré enriquecimento e enriquecimento seletivo

Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar 25g da amostra com 225ml de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* Tamponado (BLEB), com piruvato de sódio mas sem os agentes seletivos. Incubar a 30ºC/4h, adicionar os agentes seletivos e continuar a incubação a 30ºC até completar 48 horas.

Nota a.1) Pode ser feita a composição de até 10 amostras, da seguinte forma: Juntar 50g ou ml de cinco amostras (total 250g ou ml) e homogeneizar com 250ml de BLEB (com piruvato e sem os agentes seletivos). Proceder da mesma forma com as demais cinco amostras. Juntar 50g ou ml de cada uma dessas amostras compostas, já homogeneizadas e adicionar 200ml de BLEB (com piruvato e sem os agentes seletivos). Incubar a 30ºC/4h, adicionar os agentes seletivos e continuar a incubação a 30ºC até completar 48 horas. Manter 50g ou ml de cada amostra composta original sob refrigeração (5ºC) para repetições, se necessárias).

Nota a.2) O método não especifica a variação aceitável na temperatura de incubação.

b) Plaqueamento seletivo diferencial

Agitar cuidadosamente o frasco de enriquecimento seletivo e estriar (estrias de esgotamento) uma alçada em uma placa de Ágar Oxford (OXA). Incubar as placas a 35ºC e observar a presença de colônias típicas com 24h de incubação (colônias esféricas, pretas, rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina). Se não houver desenvolvimento de colônias típicas nesse intervalo, reincubar até completar 48 horas. Podem ser utilizados outros meios de cultura para o plaqueamento seletivo diferencial, sendo recomendados, em ordem de preferência: Palcam Listeria Selective Agar, 35°C/24-48h, Ágar Oxford Modificado (MOX), 35°C/24-48h e Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactan suplementado com esculina e Fe^{3+} (LPM), 30°C/24-48h. Em todos esses meios as colônias de *L.monocytogenes* são esféricas, pretas, rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina.

Nota b.1) O plaqueamento seletivo diferencial pode ser feito após 24 horas de incubação do Caldo BLEB, porém, nesse caso, deve ser repetido com 48 horas.

Nota b.2) É encorajado o uso paralelo de novos meios cromogênicos, como o BCM® (Biosynth C-0608 e C-0637) o ALOA® (AES Laboratoire), o Rapid' L. mono (Bio-Rad 356-3694 e 355-5294), o OCLA (Oxoid CM 1084), o Chromocult® *Listeria* Selective Agar (Merck 1.00427) e o CHROMagar™ *Listeria* (BBL 215085).

Nota b.3) O método não especifica a variação aceitável na temperatura de incubação.

c) Confirmação das colônias típicas

Selecionar pelo menos cinco colônias típicas de cada placa, para confirmação. Estriar (estrias de esgotamento) cada colônia em uma placa de Ágar Tripiticase de Soja com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), para purificação. Incubar as placas a 30ºC/24-48h e observar as colônias usando uma fonte forte de luz branca na parte inferior das placas, posicionadas em ângulo de 45º em relação à fonte de luz. Selecionar uma colônia azulada típica, bem isolada, para a realização das provas de confirmação.

Com uma alça de inoculação, transferir a colônia para um tubo de TSA-YE inclinado e um tubo de Caldo Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSB-YE), incubando os tubos a 30ºC/24h. Usar a cultura em ágar ou caldo para a realização das provas bioquímicas, podendo-se manter os tubos de TSB-YE a 4ºC por vários dias e usá-lo repetidamente como inóculo.

c1) Teste de catalase. A partir dos tubos de TSA-YE, transferir uma alçada da cultura para uma lâmina de microscopia, cobrir com uma gota de peróxido de hidrogênio 3% e observar

a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não-borbulhamento (teste negativo). As cepas de *Listeria* são catalase positivas.

c2) Coloração de Gram. A partir dos tubos de TSA-YE, preparar um esfregaço e submeter à coloração de Gram. Todas as espéies de *Listeria* são bastonetes curtos Gram positivos. Culturas velhas podem ser Gram variáveis e, em esfregaços muito carregados, as células podem apresentar arranjo tipo paliçada.

c3) Teste de motilidade. A partir dos tubos de TSB-YE, inocular cada cultura suspeita em tubos de Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM), por picada no centro do meio de cultura, até uma distância a 1cm do fundo. Incubar os tubos a 25°C/7 dias, observando diariamente. As cepas de *Listeria* são móveis e desenvolvem uma zona de migração típica, espalhando-se na parte superior do meio e mantendo-se restritas à picada no fundo do tubo. Esse tipo de migração produz uma massa de crescimento característica, lembrando um guarda-chuva. Alternativamente, observar a motilidade ao microscópio, em montagem úmida. Em uma lâmina de vidro, emulsionar uma alçada com inóculo pesado da cultura em uma gota de solução salina 0,85%, cobrir com uma lamínula e observar imediatamente sob imersão. As cepas de *Listeria* spp são bastonetes curtos e finos, com motilidade rotacional (tumbling motility). Sempre comparar com uma cultura padrão de *L. monocytogenes.*

Culturas com características típicas de *Listeria* nesses testes podem ser confirmadas utilizando-se um sistema comercial como o API *Listeria* (BioMeriéux), o MICRO-ID™ (BioMeriéux) o MicroArray for *Listeria* (Biolog) ou o Vitek Automicrobic Gram Positive and Gram Negative Identification Cards (BioMeriéux). Alternativamente, submeter as culturas aos testes relacionados abaixo:

c4) Teste de verificação de hemólise. Com uma caneta vidrográfica, demarcar 20 a 25 setores no fundo de uma placa de Ágar Sangue Nº 2 suplementado com sangue de carneiro. Os resultados são melhor visualizados usando-se placas com uma camada fina de meio, menor do que os usuais 5mm. A partir dos tubos de TSA-YE, inocular cada uma das culturas suspeitas em um dos setores demarcados. Fazer a inoculação tocando levemente superfície do meio, sem picar. Incubar a placa a 35°C/24-48h e observar a formação de um halo transparente de hemólise em redor das colônias. As cepas de *L. monocytogenes* formam halos discretos, que não se estendem muito para fora da região da colônia, enquanto *L. ivanovii* forma halos grandes e bem definidos e *L. innocua* não apresenta hemólise. Resultados duvidosos podem ser esclarecidos pelo CAMP Test (item c.7, abaixo)

c5) Teste de fermentação da dextrose, xilose, rhamnose, manitol, maltose e hidrólise da esculina. A partir dos tubos de TSB-YE, inocular uma alçada de cada cultura em tubos de caldo Púrpura Base suplementado com 0,5% do carboidrato a ser testado. Incubar a 35°C/7 dias e observar diariamente se há produção de ácido (alteração da cor do meio de púrpura para amarelo) e produção de gás (opcional, coletado em tubos de Durham). Nenhuma cepa de *Listeria* produz gás a partir desses compostos de carbono e todas fermentam a dextrose e a maltose e hidrolisam a esculina. *L monocytogenes* também fermenta a rhamnose mas não fermenta a xilose e o manitol. O teste de hidrólise da

esculina pode ser omitido se a reação nas placas de OXA (ou outro dos meios com esculina) se mostrou bem característica.

c6) Teste de nitrato (opcional). A partir dos tubos de TSB-YE, inocular uma alçada com inóculo pesado de cada cultura em tubos com 5ml de Caldo Nitrato e incubar a 35°C/5 dias. Após a incubação, adicionar aos tubos 0,2ml de cada um dos reagentes para teste de nitrato: 1°) Reagente A = solução 0,8% de ácido sulfanílico, 2°) Reagente B = solução 0,5% de α-naftol. Observar o desenvolvimento de uma cor rósea avermelhada em no máximo 10min (teste positivo) e, em caso negativo, adicionar uma pitada de pó de zinco, deixar em repouso por 10min e observar se o meio permanece com a cor inalterada (teste positivo) ou adquire uma coloração rósea avermelhada (teste negativo). As cepas de *L. monocytogenes* não reduzem o nitrato.

c7) CAMP Test (Christie-Atkins-Munch-Peterson Test) (opcional). Inocular uma cultura β-hemolítica de *Staphylococcus aureus* (ATCC 49444, ATCC 25923, NCTC 7428 ou CIP 5710) e uma cultura de *Rhodococcus equii* (ATCC 6939 ou NCTC 1621) em uma placa de Ágar Sangue N° 2 previamente preparada. Cada cultura deve ser inoculada em uma única estria, mantendo as duas estrias paralelas entre si. No espaço entre as estrias de *S. aureus* e *R. equii*, inocular uma única estria de cada cultura suspeita, perpendicular às outras duas, porém, sem tocá-las. Incubar a placa a 35°C/24-48h e observar a ocorrência de halo transparente de hemólise em redor das estrias inoculadas. As cepas de *L. monocytogenes* produzem uma reação de hemólise discreta, porém, nas proximidades da estria de *S. aureus*, o halo torna-se maior e mais nítido. As cepas de *L. ivanovii*, ao contrário, apresentam halo mais nítido nas proximidades da estria de *R. equii*. *L. seeligeri* apresenta reação semelhante à de *L. monocytogenes*. As outras espécies de *Listeria* não são hemolíticas e não reagem nesse teste.

Nota c.7.1) No catálogo da ATCC (Americam Type Culture Collection) a denominação atual da cepa N° 49444 é *Staphylococcus pseudintermedius*, embora tenha sido originalmente depositada como *Staphylococcus aureus*.

18.3. MÉTODO MLG/FSIS/USDA

Método do United States Department of Agriculture (USDA), descrito no Capítulo 8.07 do *Microbiology Laboratory Guidebook Online* (USDA/FSIS, 2009). Aplicação: carnes vermelhas, aves, ovos e amostras ambientais.

18.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Caldo Universidade de Vermont (UVM)
- Caldo Fraser ou Caldo de Enriquecimento de *Listeria* Tamponado com ácido morfolino-propanosulfônico (MOPS-BLEB)
- Placas de Ágar Oxford Modificado (MOX)
- Placas de Ágar Sangue de Cavalo em Sobrecamada (HL)
- Tubos de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI)
- Tubos de Ágar Infusão Cérebro Coração (BHIA) ou Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE)
- Cultura β-hemolítica de *Staphylococcus pseudointermedius* (ATCC 49444) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- Cultura de *Rhodococcus equii* (ATCC 6939)

- Discos de β-lysin (opcional)
- Sistema comercial de identificação API® *Listeria* ou VITEK 2 Compact ou MICRO-ID® *Listeria* (não citados os fabricantes)
- Estufa incubadora a 30±2ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora a 35±2ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora entre 18 e 25ºC com termômetro calibrado

18.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise para a detecção de *L. monocytogenes* pelo método do United States Department of Agriculture (USDA) encontra-se descrito na Figura 18.2.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos nos testes de presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

Cuidado. Ler atentamente as recomendações da introdução do capítulo, item 18.1, subitem "cuidados especiais na realização das análises", para familiarizar-se com as medidas necessária à segurança do analista e do laboratório.

a) Enriquecimento seletivo primário

a1.) Teste de presença/ausência. Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar 25g da amostra com 225ml do Caldo Universidade de Vermont (UVM) e incubar a 30±2ºC/22±2h.

a.2) Contagem pela técnica do NMP. Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar 25g da amostra com 225ml do Caldo Universidade de Vermont (UVM). Preparar diluições decimais seriadas usando Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato (PB) nos tubos de diluição. Transferir três alíquotas de 10ml da diluição 10^{-1} para três tubos estéreis vazios, três alíquotas de 1ml da 10^{-1} para três tubos com 9ml de UVM e três alíquotas de 1ml da 10^{-2} para três tubos com 9ml de UVM. Incubar todos os tubos e o restante da diluição 10^{-1} a 30±2ºC/22±2h. Realizar todas as etapas subseqüentes do ensaio para cada tubo separadamente, bem como para o restante da diluição 10^{-1}.

> **Nota a1)** As alíquotas indicadas acima (1 – 0,1 e 0,01g) são as mais adequadas para amostras com contagem esperada abaixo de 10/g. No caso de amostras com contagem esperada acima desse nível, inocular diluições mais altas, seguindo as orientações do Capítulo 4.

b) Enriquecimento seletivo secundário

Agitar cuidadosamente cada frasco ou tubo de enriquecimento seletivo primário e transferir 0,1±0,02ml do caldo UVM para um tubo com 10±0,5ml de Caldo Fraser ou Caldo de Enriquecimento de *Listeria* Tamponado com Ácido Morfolinopropanosulfônico (MOPS-BLEB). Incubar o Caldo Fraser a 35±2ºC/26-48±2h ou o MOPS-BLEB a 35±2ºC/18-24h. Verificar a ocorrência de escurecimento do meio, devido à hidrólise da esculina. Em caso positivo, seguir para o plaqueamento diferencial (item c). Em caso negativo, reincubar o Caldo Fraser até completar 48+2h e verificar novamente o escurecimento, submetendo ao plaqueamento as amostras positivas e descartando as amostras negativas.

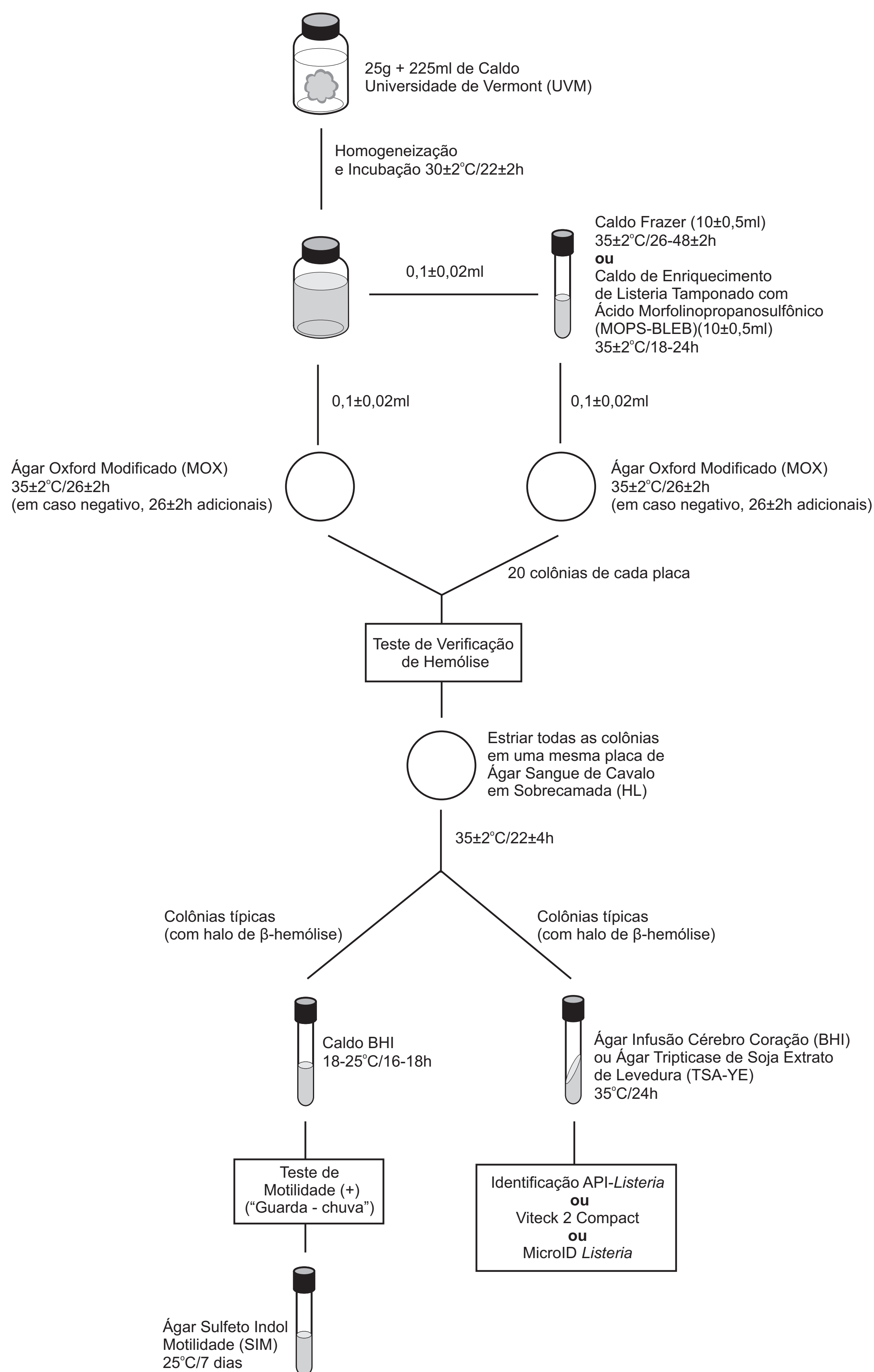


Figura 18.2. Esquema de análise para detecção de *L. monocytogenes* pelo método USDA.

c) Plaqueamento seletivo diferencial

A partir do Caldo UVM e do Caldo Fraser ou MOPS-BLEB, estriar 0,1±0,02ml da cultura em placas de Ágar Oxford Modificado (MOX). Incubar as placas de MOX a 35±2ºC/26±2h e observar a presença de colônias típicas de *L. monocytogenes* – pequenas (1mm) e rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina. Em caso negativo, reincubar as placas por mais 26±2h e verificar novamente.

d) Confirmação das colônias típicas

Tomar 20 colônias típicas de cada placa de MOX (ou o número colônias presentes, se for menor que 20) e estriar todas numa mesma placa de Ágar Sangue de Cavalo em Sobrecamada (HL). Incubar as placas a 35±2ºC/22±4h e verificar a presença de colônias típicas de *L. monocytogenes*, translúcidas com um pequeno halo de β-hemólise. A partir de uma mesma colônia típica, inocular um tubo de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e um tubo de Ágar Infusão Cérebro Coração (BHIA) ou Ágar Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE). Incubar o Caldo BHI entre 18 e 25ºC, por 16 a 18 horas, para o teste de motilidade. Incubar o Ágar BHIA ou TSA-YE a 35ºC/24h para os testes bioquímicos de confirmação. Para o teste de motilidade seguir o mesmo procedimento descrito no método da FDA (montagem úmida). Para os testes bioquímicos, utilizar os sistemas comerciais de identificação API® *Listeria*, VITEK® 2 Compact ou MICRO-ID® *Listeria* (não citados os fabricantes).

Se utilizado o API *Listeria*, o MLG/FSIS/USDA recomenda que cepas com resultado *L. monocytogenes/L.innocua* sejam submetidas à caracterização molecular baseada no RNA ribossomal. Os sistemas comerciais GeneTrak® L. *monocytogenes* ou GenProbe AccuProbe® L. *monocytogenes* (não citados os fabricantes) podem ser utilizados, seguindo as orientações dos fabricantes.

Se utilizado o MICRO-ID® *Listeria*, o MLG/FSIS/USDA recomenda que seja realizado o CAMP Test, para corroborar os resultados. Dois procedimentos podem ser utilizados para o CAMP Test, o método tradicional e teste usando discos de β-lysin.

d.1) CAMP Test (método tradicional Christie-Atkins-Munch-Peterson Test). Esse procedimento é o mesmo descrito no método do BAM/FDA, mas recomenda o Ágar Tripticase de Soja com 5% de sangue de carneiro (TSA-SANGUE) em lugar do Ágar Sangue Nº 2. Inocular uma cultura -hemolítica de *Staphylococcus pseudointermedius* (ATCC 49444) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e uma cultura de *Rhodococcus equii* (ATCC 6939) em uma placa de Ágar Tripticase de Soja com 5% de sangue de carneiro (TSA-SANGUE) previamente preparada. Cada cultura deve ser inoculada em uma única estria, mantendo as duas estrias paralelas com um espaço de 3-4cm entre si. No espaço entre as estrias de *S. aureus* ou *S. intermedius* e *R. equii*, inocular uma única estria de cada cultura suspeita, perpendicular às outras duas, porém, sem tocá-las e mantendo um espaço de 2-4mm entre si. Incluir uma cepa controle positivo de *L. monocytogenes* e uma controle negativo de *L. innocua*. Incubar a placa a 35ºC/24±2h e observar a ocorrência de halo transparente de hemólise em redor das estrias inoculadas. As cepas de *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* produzem uma reação de hemólise discreta, porém, nas proximidades da estria de *S. aureus* ou *S. intermedius*, o halo torna-se maior e mais nítido. As cepas de *L. ivanovii*, ao contrário, apresentam halo mais nítido nas proximidades da estria de *R. equii*. Se uma cepa suspeita β-hemolítica em HL não apresentar resultado típico em 24h, reincubar a placa de TSA-Sangue a 35±2ºC até completar 48+2h. Se o resultado continuar atípico, recomenda-se

que a cepa seja submetida à caracterização molecular baseada no RNA ribossomal (GeneTrak® L. *monocytogenes* ou GenProbe AccuProbe® L. *monocytogenes*).

d.2) β-lysin CAMP Teste. Esse método é o mais recomendado pelo MLG/FSIS/USDA. Posicionar um disco de β-lysin no centro de uma placa preparada com uma camada fina (9+1ml) de Ágar Tripticase de Soja com 5% de sangue de carneiro (TSA-SANGUE). Inocular até seis culturas suspeitas na placa, fazendo uma estria radial a partir da região bem próxima do disco de β-lysin, mas sem tocá-lo. Incluir uma cepa controle positivo de *L. monocytogenes* e uma controle negativo de *L. innocua*. Incubar a placa a 35+2°C/24+2h e observar a ocorrência de halo transparente de hemólise em redor das estrias, na região próxima do disco de β-lysin (teste positivo). As cepas de *L. monocytogenes*, *L.seeligeri* e *L. ivanovii* apresentam resultado positivo nesse teste, mas *L.ivanovii* apresenta β-hemólise intensificada na região mais afastada do disco, o que permite distingui-la. As espécies de *Listeria* não hemolíticas não reagem nesse teste. Se uma cepa suspeita β-hemolítica em HL não apresentar resultado positivo em 24h, reincubar a placa de TSA-Sangue a 35+2°C até completar 48±2h. Se o resultado continuar negativo, recomenda-se que a cepa seja submetida à caracterização molecular baseada no RNA ribossomal (GeneTrak® L. *monocytogenes* ou GenProbe AccuProbe® L. *monocytogenes*).

18.4. MÉTODO APHA DE PLAQUEAMENTO DIRETO
Contagem de *L. monocytogenes* em placas

Método sugerido pela American Public Health Association (APHA), no Capítulo 36 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Ryser & Donnelly, 2001). Aplicação: enumeração em alimentos “in natura” (leite cru, carnes cruas, pescado cru, vegetais não processados) e em ambiente industrial, nos quais as células não sofreram injúria sub-letal. Limite de detecção do procedimento padrão: 100 UFC/g de alimentos sólidos e 10 UFC/ml de produtos líquidos.

18.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água peptonada 0,1% (H_2Op)
- Tubos de diluição com 9ml de H_2Op/tubo
- Pipetas de 1ml

Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem

- Placas de Ágar Oxford Modificado (MOX)
- Alça de espalhamento (Drigalski) mergulhada em etanol 70%
- Estufa incubadora regulada a 35±2°C com termômetro calibrado

Confirmação

- Os mesmos itens requeridos no método da FDA ou do USDA

18.4.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise para a contagem de *L. monocytogenes* pelo método APHA de plaqueamento direto encontra-se descrito na Figura 18.3.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

Cuidado. Ler atentamente as recomendações da introdução do capítulo, item 18.1, subitem "cuidados especiais na realização das análises", para familiarizar-se com as medidas necessária à segurança do analista e do laboratório.

a) Preparação da amostra e diluições seriadas. Seguir os procedimentos descritos no Capítulo 2.

b) Inoculação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular 0,1ml de cada diluição na superfície de placas de Ágar Oxford Modificado (MOX), previamente preparadas e secadas. Espalhar o inóculo com uma alça de Drigalski, das placas de maior para as placas de menor diluição, até que todo o excesso de líquido seja absorvido. Se as contagens estimadas de *L. monocytogenes* na amostra forem menores do que 100/g ou ml, inocular 1ml da primeira diluição, distribuindo o volume por quatro placas, três com 0,3ml e uma com 0,1ml.

c) Incubação. Aguardar que as placas sequem e incubar invertidas, a 35±2°C/26±2h.

d) Contagem das colônias presuntivas. Selecionar placas com 20 a 200 colônias e contar as colônias típicas de *L. monocytogenes* – pequenas (1mm) e rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina. Em caso negativo, reincubar as placas até completar 48±2h e verificar novamente.

e) Confirmação das colônias típicas. Selecionar cinco colônias típicas e submeter à confirmação, da mesma forma descrita no método da FDA ou do USDA.

f) Cálculo dos resultados. Calcular o número de UFC/g ou ml em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

Exemplo 1: Diluição 10^{-2}, 30 colônias típicas, cinco submetidas à confirmação, três confirmadas (60%). UFC/g ou ml = $30x10^2x10x0,6 = 1,8x10^4$.

Exemplo 2: Diluição 10^{-2}, 30 colônias suspeitas (20 típicas e 10 atípicas), 10 submetidas à confirmação (cinco típicas e cinco atípicas), sete confirmadas (cinco típicas = 100% e duas atípicas = 40%). UFC/g ou ml = $(20x10^2x10x1,0) + (10x10^2x10x0,4) = 2,4x10^4$.

18.5. MÉTODO ISO 11290-2:1998 AMENDMENT 1:2004 Contagem de *L. monocytogenes* em placas

Método da International Organization for Standardization, aplica-se a todos os alimentos destinados ao consumo humano e às rações animais. Limite de detecção do procedimento padrão: 100 UFC/g de alimentos sólidos e 10 UFC/ml de produtos líquidos.

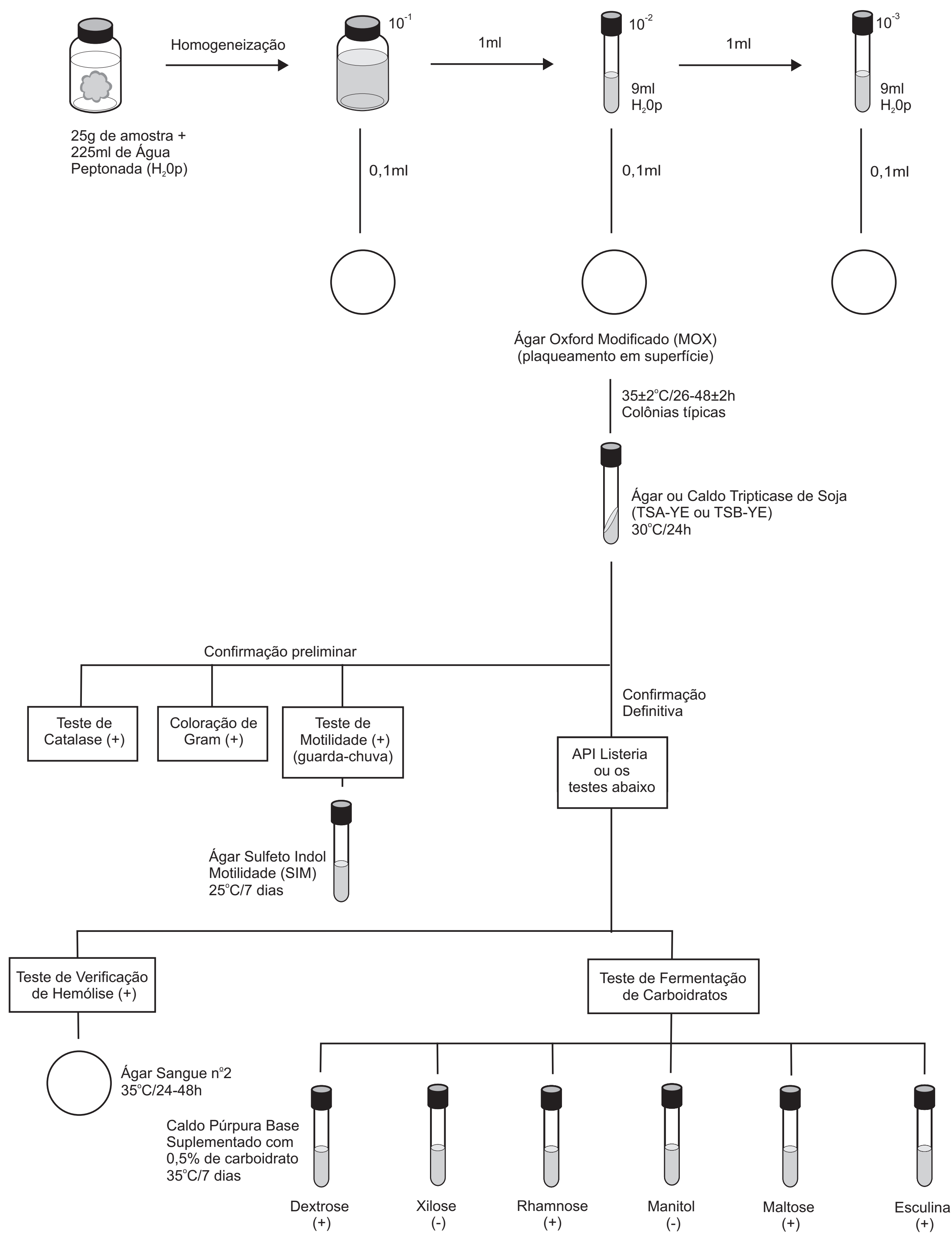


Figura 18.3. Esquema de análise para a contagem de *L. monocytogenes* pelo método APHA de plaqueamento direto.

18.5.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparacão da amostra e diluições seriadas

- Diluente: Água Peptonada Tamponada (BPW) ou Caldo Half-Fraser
- Tubos de diluição com 9ml de BPW
- Pipetas de 1ml

Contagem

- Placas de Ágar Listeria Ottaviani & Agosti (ALOA)
- Alça de espalhamento (Drigalski) mergulhada em etanol 70%
- Estufa incubadora regulada a 20±2°C com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 37±1°C com termômetro calibrado

Confirmação

- Placas de Ágar Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE)
- Tubos de Caldo Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSB-YE)
- Tubos de Meio Teste de Motilidade ISO (opcional)
- Reagente para teste de catalase (peróxido de hidrogênio a 3%)
- Reagentes para coloração de Gram
- Placas de Ágar Sangue N° 02
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% xilose
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% rhamnose
- Cultura de *Staphylococcus aureus* beta-hemolítico (ATCC 25923, NCTC 1803 ou as citadas no método BAM/FDA) (opcional)
- Cultura de *Rhodococcus equii* (ATCC 6939 ou NCTC 1621) (opcional)
- Estufa incubadora a 25±1°C (opcional para teste de motilidade)
- Estufa incubadora a 37±1°C com termômetro calibrado

18.5.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise para a contagem de *L. monocytogenes* em placas pelo método ISO 11290-2:1998 amendment 1:2004 encontra-se descrito na Figura 18.4.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

Cuidado. Ler atentamente as recomendações da introdução do capítulo, item 18.1, subitem "cuidados especiais na realização das análises", para familiarizar-se com as medidas necessária à segurança do analista e do laboratório.

a) Preparação da amostra e recuperação de células injuriadas

Homogeneizar 25g da amostra com 225ml de Água Peptonada Tamponada (BPW) ou Caldo Half-Fraser, seguindo as orientações do Capítulo 2. Incubar a 20±2°C/1h±5min, para recuperação de células injuriadas.

> **Nota a.1)** O uso do Caldo Half-Fraser é recomendado quando há interesse em submeter a mesma unidade analítica ao método quantitativo e, também, qualitativo de análise (ISO 11290-1:1996 – amendment 1:2004).

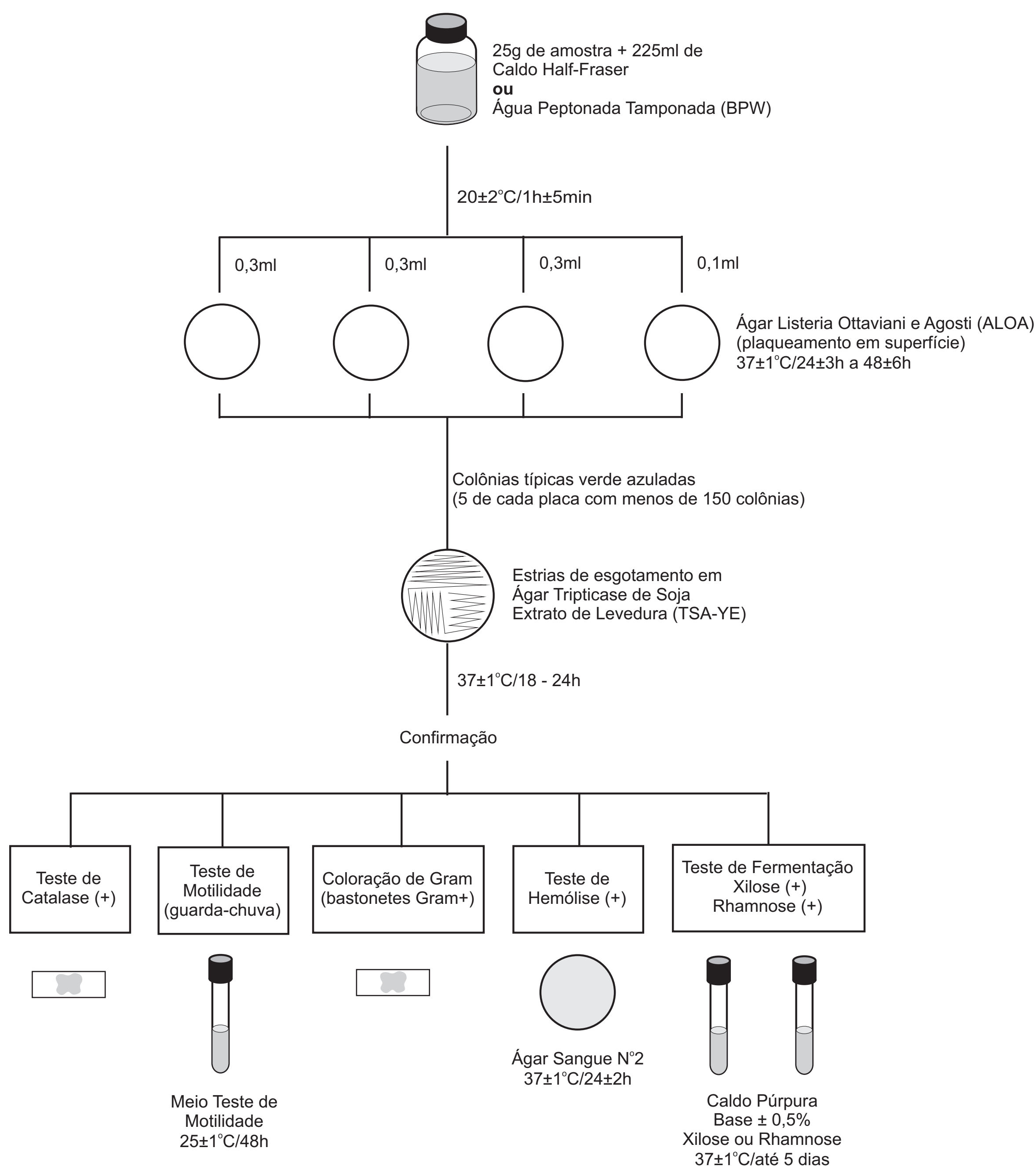


Figura 18.4. Esquema de análise para a contagem de *L. monocytogenes* em placas pelo método ISO 11290-2:1998 amendment 1:2004.

b) Inoculação e incubação

Inocular 0,1ml da amostra na superfície de placas de Ágar Listeria Ottaviani & Agosti (ALOA), plaqueamento em superfície, em duplicata. Espalhar o inóculo com uma alça de Drigalski, até que todo o excesso de líquido seja absorvido. Se a contagem estimada de *L. monocytogenes* na amostra for menor do que 100/g ou ml, inocular 1ml da primeira diluição, em duplicata, em uma placa de 140mm de diâmetro ou distribuindo o volume em três placas de 90mm de diâmetro. Se, ao contrário, a contagem estimada for mais alta, preparar e inocular diluições decimais seriadas, usando BPW como diluente. Aguardar que as placas sequem e incubar invertidas, a 37±1°C/24±3h-48±6h.

Nota b.1) A ISO 7218:2007(E) já não exige a inoculação em duplicata quando são inoculadas pelo menos duas diluições decimais seriadas.

c) Contagem das colônias presuntivas e seleção para confirmação

Contar as colônias típicas com 24±3h de incubação ou, se o crescimento for muito pobre ou ausente, com 48±6h. As colônias de *L. monocytogenes* no ALOA são verde-azuladas e rodeadas por um halo opaco.

Nota c.1) Há cepas de *L. monocytogenes* que, em condições de "stress" (particularmente provocado por ácidos), formam halo muito fraco ou não formam halo.

Nota c.2) Há cepas de *L. monocytogenes* que apresentam atividade fraca de fosfatidil inositol fosfolipase, detectada apenas com incubação prolongada (quatro dias, por exemplo). Algumas dessas cepas são patogênicas.

Selecionar para a confirmação cinco colônias típicas de cada placa com menos de 150 colônias típicas. Havendo menos de cinco em alguma placa, selecionar todas. Purificar a cultura de cada colônia inoculando por estrias de esgotamento em uma placa de Ágar Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE). Incubar as placas a 37±1°C/18-24h ou até que o crescimento seja satisfatório. No TSA-YE, as colônias de *Listeria* são azuladas, quando observadas com uma fonte forte de luz branca na parte inferior das placas, posicionadas em ângulo de 45° em relação à fonte de luz. Utilizar uma colônia típica bem isolada da placa de TSA-YE para os testes de confirmação.

d) Confirmação das colônias típicas

A confirmação segue basicamente os mesmos testes e procedimentos do método BAM FDA, com alguma variação na temperatura e tempo de incubação de alguns ensaios:

d.1) Teste de catalase. Segue o mesmo procedimento descrito no método BAM/FDA (item 18.2.2.c.1).

d2) Coloração de Gram. Segue o mesmo procedimento descrito no método BAM/FDA (item 18.2.2.c.2).

d.3) Teste de motilidade (opcional). Para observação da motilidade ao microscópio, em montagem úmida, cultivar a cultura em Caldo Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSB-YE), a 25±1°C/8-24h (o tempo necessário para crescimento visível). O procedimento é o mesmo descrito no método BAM/FDA (item 18.2.2.c.3). Para observação da motilidade em meio semi-sólido, utilizar a cultura obtida em TSA-YE para inocular um tubo de Meio Teste de Motilidade ISO, por picada, até uma distância a 1cm do fundo. Incubar os tubos a 25±1°C/48h e observar as mesmas características descritas no método BAM/FDA (item 18.2.2.c.3).

Nota d.3) O teste de motilidade é opcional, podendo ser dispensado se o analista é bem treinado na rotina de detecção de *L. monocytogenes*.

d.4) Teste de verificação de β-hemólise. Segue o mesmo procedimento do método BAM/FDA (item 18.2.2.c.4), mas a incubação das placas de Ágar Sangue é feita a 37±1°C/24±2h. Pode ser substituído pelo CAMP Test.

d.5) Teste de fermentação da xilose e rhamnose. Segue o mesmo procedimento do método BAM/FDA (item 18.2.2.c.5), mas a incubação dos tubos é feita a 37±1°C por até cinco dias.

d.6) CAMP Test (Christie-Atkins-Munch-Peterson Test) (opcional). Segue o mesmo procedimento do método BAM/FDA (item 18.2.2.c.7), mas a incubação é feita a 37±1°C/18-24h. Não é requerido se os resultados do teste de hemólise são conclusivos.

e) Interpretação dos resultados dos testes de confirmação

Seguir as orientações do Quadro 18.4. As cepas de *L. monocytogenes* são bastonetes Gram positivos, móveis (motilidade rotacional em montagens úmidas ou tipo "guarda-chuva" em meio semi-sólido), usualmente catalase positivas.

Quadro 18.4. Características típicas das espécies de *Listeria* para interpretação dos testes de confirmação no método ISO 11290-2:1998 amendment 1:2004.

Espécie	β-hemólise	Ácido a partir de		CAMP Test	
		Rhamnose	Xilose	*S. aureus*	*R. equii*
L. monocytogenes	+	+	-	+	-
L. innocua	-	V	-	-	-
L. ivanovii	+	-	+	-	+
L. seeligeri	(+)	-	+	(+)	-
L. welshimeri	-	V	+	-	-
L. grayi	-	-	-	-	-

V = variável, (+) = fraco, + = 90% das cepas positivas, - = negativo.

Nota. Há raras cepas de *L. monocytogenes* que não apresentam β-hemólise ou uma reação positiva no CAMP Test, nas condições recomendadas nesse método.

f) Cálculo dos resultados

Em primeiro lugar, calcular o número total de colônias de *L. monocytogenes* em cada placa da qual foram tomadas colônias típicas presuntivas para confirmação (todas as placas com menos de 150 colônias típicas). Esse número é função do número total de colônias típicas contadas e da percentagem de colônias confirmadas. Por exemplo, numa placa com 150 colônias típicas, cinco submetidas à confirmação e quatro confirmadas (80%), o número de colônias de *L. monocytogenes* é 150x0,8 = 120.

Em segundo lugar, calcular o número de UFC (unidades formadoras de colônias) por grama ou mililitro da amostra. Esse valor é igual à soma das colônias de *L. monocytogenes* em todas as placas da quais foram tomadas colônias típicas presuntivas para confirmação, dividido pela soma da quantidade de amostra inoculada em todas essas placas (exemplos 1 e 2)

Se em nenhuma placa da primeira diluição o número de colônias típicas chegou a 15, calcular o resultado, mas relatar como contagem estimada (exemplo 3).

Se em nenhuma placa foi observado crescimento, calcular o resultado de uma colônia e relatar como "menor do que o valor obtido" (exemplo 4).

Exemplo 1) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}e 10^{-2}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}
Colônias típicas	150	17
Colônias submetidas à confirmação	5	5
Colônias confirmadas	4 (80%)	3 (60%)
Colônias de *L. monocytogenes*	150x0,8 = 120	17x0,6 = 10
Quantidade de amostra inoculada	$0,1x10^{-1}$	$0,1x10^{-2}$
Soma das colônias	120+10 = 130	
Soma das quantidades inoculadas	$0,1x10^{-1} + 0,1x10^{-2} = 0,011$	
UFC/g ou ml	130/0,011 = 11.818,18 = 11.818 = $1,2x10^{4}$	

Exemplo 2) Inoculados 0,1ml da diluição 10^{-1}, em duplicata. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	
Colônias típicas	130	142
Colônias submetidas à confirmação	5	5
Colônias confirmadas	3 (60%)	3 (60%)
Colônias de *L. monocytogenes*	78	85
Soma das colônias	78+85 = 163	
Soma das quantidades inoculadas	$2x0,1x10^{-1} = 0,02$	
UFC/g ou ml	163/0,02 = 8.150 = $8,2x10^{3}$	

Exemplo 3) Inoculados 0,1ml da diluição 10^{-1}, em duplicata. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	
Colônias típicas	12	10
Colônias submetidas à confirmação	5	5
Colônias confirmadas	2 (40%)	2 (40%)
Colônias de *L. monocytogenes*	5	4
Soma das colônias	5+4=9	
Soma das quantidades inoculadas	$2x0,1x10^{-1} = 0,02$	
UFC/g ou ml	9/0,02 = 450 = $5,0x10^{2}$ (est)*	

*Contagem estimada.

Exemplo 4) Inoculados 0,1ml da diluição 10^{-1}, em duplicata. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	
Colônias típicas e atípicas	0	0
Colônias submetidas à confirmação	0	0
Colônias confirmadas	0	0
Colônias de *L. monocytogenes*	0	0
Soma das colônias	<1	
Soma das quantidades inoculadas	$2x0,1x10^{-1} = 0,02$	
UFC/g ou ml	<1/0,02 = <100 = $<1,0x10^{2}$	

18.6. MÉTODO ISO 11290-1:1996 AMENDMENT 1:2004
Presença ou ausência de *L. monocytogenes*

Método da International Organization for Standardization, aplica-se a todos os alimentos destinados ao consumo humano e às rações animais.

18.6.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Caldo Half-Fraser
- Caldo Fraser
- Placas de Ágar Listeria Ottaviani & Agosti (ALOA)
- Placas de um 2º meio opcional, de escolha do laboratório
- Placas de Ágar Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE) inclinados
- Tubos de Caldo Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSB-YE)
- Tubos de Meio Teste de Motilidade ISO (opcional)
- Reagente para teste de catalase (peróxido de hidrogênio a 3%)
- Reagentes para coloração de Gram
- Placas de Ágar Sangue Nº 02
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% xilose
- Tubos de Caldo Púrpura Base com 0,5% rhamnose
- Cultura de *Staphylococcus aureus* beta-hemolítico (ATCC 25923, NCTC 1803 ou as citadas no método BAM/FDA) (opcional)
- Cultura de *Rhodococcus equii* (ATCC 6939 ou NCTC 1621) (opcional)
- Estufa incubadora regulada a 30±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 35±1ºC ou 37±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora a 25±1ºC (opcional para teste de motilidade)

18.6.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise para a detecção de *L. monocytogenes* pelo método ISO 11290-1:1996 amendment 1:2004 encontra-se descrito na Figura 18.5.

a) Enriquecimento primário

Homogeneizar 25g da amostra com 225ml de Caldo Half-Fraser, seguindo as orientações do Capítulo 2. Incubar a 30±1ºC/24±2h. Pode ocorrer escurecimento do meio durante a incubação.

b) Enriquecimento secundário

Inocular 0,1ml da amostra enriquecida em 10ml de Caldo Fraser. Incubar a 35±1ºC ou 37±1ºC/48±2h.

Nota b.1) A temperatura de incubação (35 ou 37ºC) deve ser acordada entre as partes e relatada no relatório.

c) Plaqueamento seletivo diferencial

A partir do caldo Half-Fraser, inocular uma alçada da cultura (estrias de esgotamento) em uma placa de Ágar Listeria Ottaviani & Agosti (ALOA) e uma alçada em um segundo meio, de livre escolha do laboratório. Repetir esse procedimento com o caldo Fraser. Incubar as placas de

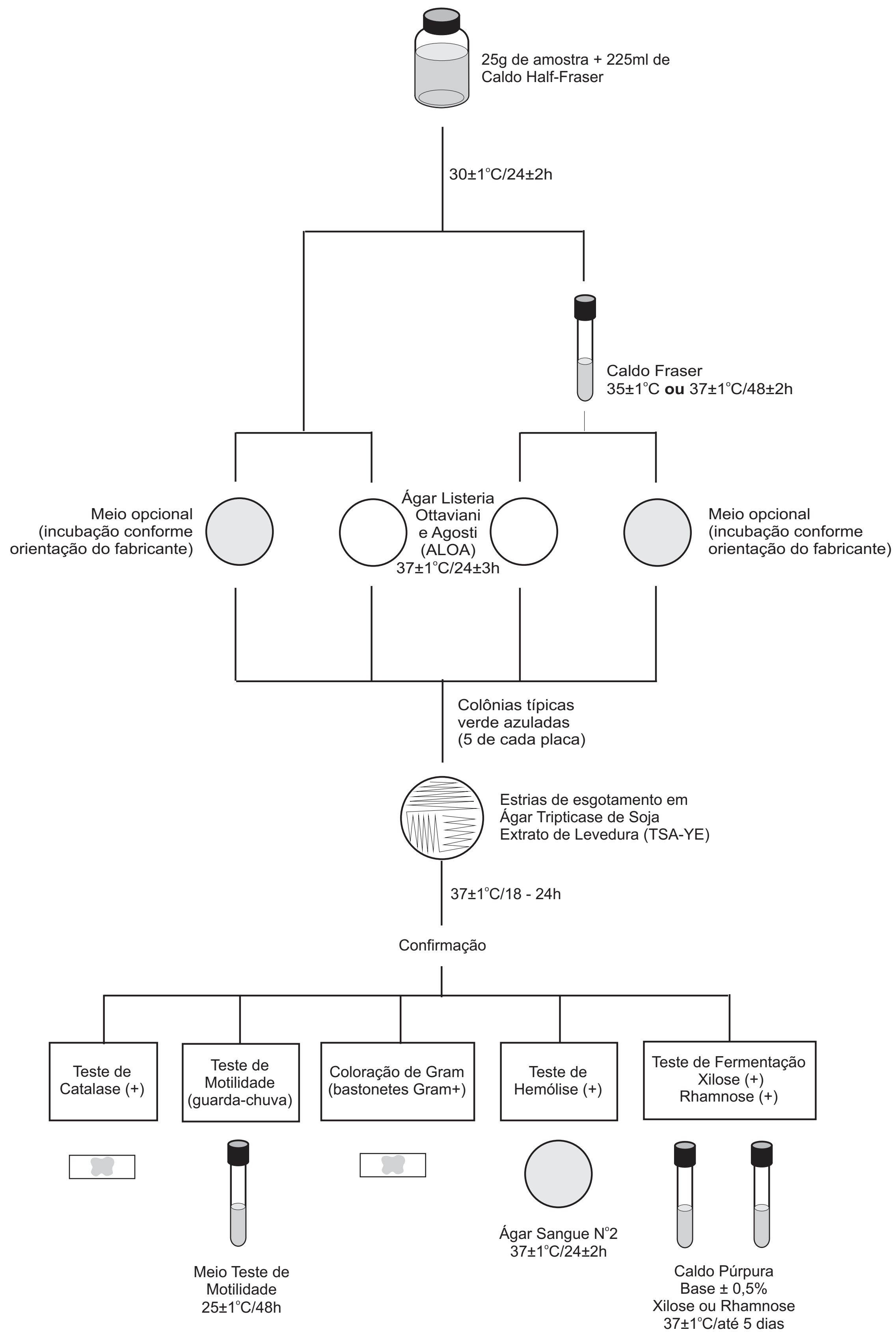


Figura 18.5. Esquema de análise para a detecção de *L. monocytogenes* pelo método ISO 11290-1:1996 amendment 1:2004.

ALOA invertidas, a 37±1°C/24±3h. Se não houver desenvolvimento de colônias típicas ou se o crescimento for muito pobre, reincubar as placas por 24±3h adicionais.

Incubar as placas do segundo meio opcional de acordo com a orientação do fabricante ou de outros métodos em que sejam utilizadas.

> **Nota c.1)** O segundo meio de plaqueamento é de livre escolha do laboratório, podendo ser usados, por exemplo: Ágar Oxford (OXA 35°C/24-48h), Ágar Palcam (35°C/24-48h), Ágar Oxford Modificado (MOX 35°C/24-48h) ou Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactan suplementado com esculina e Fe^{3+} (LPM 30°C/24-48h).

d) Seleção das colônias e purificação das culturas para a confirmação

Após o período de incubação, verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *L. monocytogenes* nos meios de plaqueamento diferencial. No ALOA as colônias de típicas são verde-azuladas e rodeadas por um halo opaco.

> **Nota d.1)** Há cepas de *L. monocytogenes* que, em condições de "stress" (particularmente provocado por ácidos), formam halo muito fraco ou não formam halo.
> **Nota d.2)** Há cepas de *L. monocytogenes* que apresentam atividade fraca de fosfatidil inositol fosfolipase, detectada apenas com incubação prolongada (quatro dias, por exemplo). Algumas dessas cepas são patogênicas.

No segundo meio de plaqueamento, seguir as orientações do fabricante ou dos outros métodos em que sejam utilizados, para verificar as características típicas das colônias de *L. monocytogenes.*

No fundo de cada placa inoculada, marcar cinco colônias típicas para a confirmação e, se houver menos de cinco, marcar todas. Estriar (estrias de esgotamento) a cultura de cada colônia selecionada em uma placa de Ágar Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE), para purificação. Incubar as placas, invertidas, a 35±1°C ou 37±1°C/18-24h ou até que o crescimento seja satisfatório. No TSA-YE, as colônias de *Listeria* são azuladas, quando observadas com uma fonte forte de luz branca na parte inferior das placas, posicionadas em ângulo de 45° em relação à fonte de luz. Utilizar uma colônia típica bem isolada para os testes de confirmação.

e) Confirmação das colônias típicas e interpretação dos resultados

Segue o mesmo procedimento descrito no método ISO 11290-2 de contagem em placas.

18.7. REFERÊNCIAS

AOAC, 2009. Rapid Methods Adopted as AOAC Official Methods. Disponível no site <http://www.aoac.org/vmeth/oma_testkits.pdf>, acesso em 28/8/09.

DSMZ, 2010. Bacterial nomenclature up-to-date. Disponível no site <http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature.php>. Acesso em 11/03/2010.

DSMZ, 2005. Bacterial nomenclature up-to-date. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, disponível no site <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>. Acesso em 14/03/06.

HOLT, J.G., *et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9.ed.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HITCHINS, A.D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: U S Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online*, disponível no site <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>,acesso em 27/12/05. Chapter 10, revised January 2003.

INFORME-NET DTA, 2003. *Listeria monocytogenes*/listeriose. *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos*. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponível no site < http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Listeria.htm >, acesso em 17/02/06.

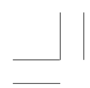
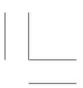
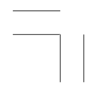
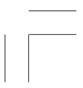
ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *General requirements and guidance for microbiological examinations, 3rd ed*. 2007. The International Organization for Standardization.

ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: detection method, 1st ed*. 1996. The International Organization for Standardization, Amendment 1: 15/10/2004.

ISO 11290-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 2: Enumeration method, 1st ed*. 1998. The International Organization for Standardization, Amendment 1: 15/10/2004.

RYSER, E.T. & DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed*. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 36, p.343-356.

USDA/FSIS. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. In: United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS), *Microbiology Laboratory Guidebook*. Disponível no site <http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp>, acesso em 25/10/2009). Chapter 8.07, revised August 2009.

Capítulo 19

Salmonella

19.1. INTRODUÇÃO

Salmonella é o principal agente de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo (WHO, 2005) e também no Brasil. De acordo com Eduardo *et al.* (2003), entre 1999 e 2003 foram notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE) 1.024 surtos de diarréia, envolvendo 27.499 casos. Dos 459 surtos com etiologia identificada, 325 (70,8%) foram causados por bactérias e, dentre esses, 140 (43,1%) foram devido à *Salmonella*, envolvendo 3.001 pacientes. Nos Estados Unidos, a cada ano são reportados aproximadamente 40.000 casos de salmonelose e, considerando que os menos agudos não são diagnosticados, esse número deve ser 30 ou mais vezes maior (CDC, 2005). A Food and Drug Administration relata uma estimativa de dois a quatro milhões de casos por ano (FDA/CFSAN, 2005).

Classificação taxonômica de *Salmonella*

As informações abaixo são da 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Popoff & Le Minor, 2005) e do Release 3.20 Online da 3ª Edição do livro *The Prokaryotes* (Ellermeier & Slauch, 2005).

Salmonella é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, definido como bastonetes Gram negativos não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. A classificação e a nomenclatura são controvertidas: Oficialmente o gênero é composto de uma única espécie, *Salmonella choleraesuis*, dividida em sete subspécies, que também são conhecidas por algarismos romanos: I. *choleraesuis*, II. *salamae*, IIIa. *arizonae*, IIIb. *diarizonae*, IV. *houtenae*, V. *bongori* e VI. *indica*. Em 1987 foi feita uma proposta de mudança do nome de *Salmonella choleraesuis* para para *Salmonella enterica* e, em 1989, a proposta de elevação da subspécie *bongori* à categoria de espécie. Essas propostas receberam apoio unânime do "Subcommittee on *Enterobacteriaceae*" do "International Committee on Systematic Bacteriology", no "Fourteenth International Congress of Microbiology", mas não foram oficializadas pelo Comitê Internacional de Nomenclatura de bactérias. Ainda assim, foram adotadas e são utilizadas pelo CDC (US Center for Disease Control and Prevention), ASM (American Society for Microbiology) e OMS (Organização Mundial de Saúde). Então, a situação taxonômica corrente é a apresentada no Quadro 19.1.

Quadro 19.1. Classificação taxônomica e nomenclatura de *Salmonella* (Ellermeier & Slauch, 2005).

Numeração das subpspécies	Classificação e nomenclatura oficiais	Nomenclatura adotada pelo CDC, ASM, OMS e 2a Ed. do Bergey's Manual of Systematic Bacteriolog (Popoff & Le minor, 2005)*
I	*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*	*Salmonella enterica* subsp. *enterica*
II	*Salmonella choleraesuis* subsp. *salamae*	*Salmonella enterica* subsp.*salamae*
IIIa	*Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*	*Salmonella enterica* subsp. *arizonae*
IIIb	*Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*	*Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*
IV	*Salmonella choleraesuis* subsp. *houtenae*	*Salmonella enterica* subsp. *houtenae*
VI	*Salmonella choleraesuis* subsp. *indica*	*Salmonella enterica* subsp. *indica*
V	*Salmonella choleraesuis* subsp. bongori	*Salmonella bongori*

* CDC = US Center for Disease Control and Prevention, ASM = American Society for Microbiology, OMS = Organização Mundial de Saúde.

As cepas mais freqüentemente envolvidas nas doenças humanas são as de *S. enterica* subsp. *enterica*, que tem por habitat os animais de sangue quente e respondem por 99% das salmoneloses humanas. *S. enterica* subsp. *salamae*, subsp. *arizonae* e subsp. *diarizonae* são freqüentemente isoladas do conteúdo intestinal de animais de sangue frio e raramente de humanos ou animais de sangue quente. *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. bongori* são predominantemente isoladas do ambiente e raramente são patogênicas para humanos.

Classificação sorológica de *Salmonella*

As informações abaixo são da 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Popoff & Le Minor, 2005), do Release 3.20 Online da 3ª Edição do livro *The Prokaryotes* (Ellermeier & Slauch, 2005) e do artigo *Salmonella Nomenclature*, de Brenner *et al.* (2000).

A classificação de *Salmonella* em espécies é pouco usada nos estudos epidemiológicos, sendo mais conhecida e utilizada a nomenclatura relacionada com a sorotipagem. O esquema utilizado na divisão em sorotipos é o de Kauffmann-White, baseado nas diferenças encontradas em certas estruturas superficiais das células, que são antigênicas. Essas estruturas são o envelope celular ou cápsula (antígenos capsular "Vi"), a parede celular (antígenos somáticos "O") e os flagelos (antígenos flagelares "H").

Os antígenos somáticos têm sua base química na diversidade de polissacarídeos da parede celular das bactérias Gram negativas. A parede celular é composta de uma camada interna de peptidoglicano, seguida de uma dupla camada lipídica externa, composta de lipoproteínas, fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são a parte mais externa da parede celular e têm a função de proteger as células dos fatores ambientais. Nas bactérias patogênicas, também têm um importante papel na interação bactéria/hospedeiro, com efeito marcante no sistema imunológico.

Os LPS são divididos em três porções, o lipídio A, interno, o core, intermediário e uma cadeia polissacarídica externa, que constitui a região antigênica "O". O lipídio A é a causa predominante dos efeitos endotóxicos dos LPS, enquanto a cadeia polissacarídica é a parte imunologicamente dominante da molécula. Estruturalmente, essa cadeia pode diferir, de um sorotipo para outro, no tipos de monossacarídeos presentes, nos tipos de ligação entre esses monossacarídeos e em modificações menores, como a acetilação dos monossacarídeos, por exemplo.

Os antígenos "O" são termoestáveis (100 ou 120ºC/2h) e há um grande número de fatores antigênicos caracterizados, identificados por números. Desses, o esquema de Kauffman-White reconhece 67, que são usados para a identificação sorológica de *Salmonella*.

Em função da sua importância no diagnóstico, os fatores são classificados como antígenos maiores ou principais e antígenos menores ou secundário. Os antígenos maiores servem de base para a separação das cepas de *Salmonella* em sorogrupos somáticos. Por exemplo, o Grupo somático "A" inclui todas as cepas que apresentam o fator O:2, não encontrado em qualquer outro sorogrupo. Os antígenos menores são aqueles com menor valor discriminatório, podendo ser encontrados em cepas de mais de um sorogrupo. Por exemplo, todas as cepas dos grupos "A", "B" e "D" apresentam o fator O:12, além do fator que caracteriza o grupo.

Muitos antígenos menores surgem de pequenas modificações químicas na seqüência da cadeia polissacarídica, freqüentemente intermediadas por bacteriófagos. Por exemplo, a sequência de unidades que se repete na cadeia das cepas do sorogrupo "B" (O:4, 12) é ceto-deoxioctonato, heptose, glicose, galactose, N-acetilglicosamina, rhamnose, manose e abequose. Se ocorrer uma acetilação da abequose, o grupo "B" vai apresentar cepas com o fator O:5. Se a ligação 1-4 entre entre a galactose e a glicose for transformada numa ligação 1-6 por conversão fágica, o grupo vai apresentar cepas com o fator O:1.

Os antígenos capsulares, muito comuns em outros gêneros de enterobactérias (*Escherichia coli* e *Klebsiella*, por exemplo), são encontrados em poucos sorotipos de *Salmonella*. Um antígeno capsular específico bem conhecido é o antígeno Vi, que ocorre em apenas três sorotipos de *Salmonella*, Typhi, Paratyphi C e Dublin. As cepas desses sorotipos podem apresentar ou não o antígeno Vi que, se presente, encobre os antígenos somáticos e impede sua aglutinação com o anti-soro somático. O aquecimento a 100ºC geralmente solubiliza o Vi, permitindo a aglutinação com o anti-soro somático apropriado.

Os antígenos flagelares "H" são derivados do flagelo das cepas móveis. São termossensíveis e decorrem de variações na seqüência de aminoácidos da proteína flagelar (flagelina, uma subunidade do filamento helicoidal que forma o flagelo). A maioria das salmonelas apresenta expressão antigênica flagelar bifásica, isto é, uma mesma cepa pode produzir dois tipos de flagelos, com características antigênicas diferentes. A alternância na produção de hora um, hora outro tipo de flagelo é chamada de variação de fase. Alguns poucos sorotipos são monofásicos, produzindo apenas um tipo de flagelo (sorotipos Typhi e Enteritidis, por exemplo) e outros são imóveis, não produzindo qualquer tipo de flagelo (sorotipos Pullorum e Gallinarum, por exemplo). Os fatores antigênicos da fase um foram originalmente identificados por letras minúsculas e, quando todas as letras do alfabeto foram utilizadas, a letra z, seguida de um número subscrito passou a ser utilizada para identificar os novos fatores (o último descrito é z_{71}). Os antígenos da fase dois são designados por números, mas algumas cepas produzem antígenos da fase um na fase dois que, nesse caso, também são identificados por letras.

O esquema de Kauffmann-White identifica os sorotipos de *Salmonella* através de uma fórmula composta de números e letras, que definem o(s) antígeno(s) "O", "Vi" e "H" presentes. A seqüência é: 1º) os antígenos somáticos, 2º) o antígeno Vi, se presente e, entre parênteses se a presença não for constante naquele sorotipo, 3º) os antígenos flagelares da fase um e 4º) os antígenos flagelares da fase dois, se presentes. Exemplos:

Sorotipo **9,12,[Vi]:d:-** significa fator somático maior **O:9**, menor **O:12**, **Vi** pode estar presente ou não (entre parênteses), o antígeno flagelar da fase um é **d**, e não apresenta antígeno flagelar da fase dois (monofásico).

Sorotipo **1,4,[5],12:b:1,2** significa: fator somático **O:1** sublinhado (indica que foi originado por conversão fágica), fator somático maior **O:4**, fatores somáticos menores **O:5** (entre parênteses indicando que pode estar presente ou não) e **O:12**, o antígeno flagelar da fase um é **b** e os antígenos flagelares da fase dois são **1** e **2**.

Até 2004, um total de 2.501 diferentes sorotipos de *Salmonella* já haviam sido identificados. A fórmula antigênica de cada um desses sorotipos é definida e mantida pelo Centro de Referência e Pesquisa em *Salmonella* do Instituto Pasteur (França), colaborador da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

A nomenclatura dos sorotipos. Os sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* (oficialmente *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*) também são definidos por nomes que, por muito tempo foram considerados espécies. Essa é outra fonte de confusão e controvérsia na nomenclatura de *Salmonella*. Como apenas uma espécie é reconhecida oficialmente, os nomes dos sorotipos não deveriam ser grafados da mesma forma estabelecida para espécies, que é: nome do gênero em maiúscula, nome da espécie (e subspécie) em minúscula, normalmente em itálico ou destacado de outra forma, como negrito ou sublinhado. Entretanto, o nome de quatro sorotipos ainda se encontram na lista de nomes oficiais, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* e *Salmonella typhimurium*. A forma de grafar os nomes dos sorotipos, utilizada pelo CDC, ASM e OMS, é com letra maiúscula e não em itálico. Por exemplo, o sorotipo **1,4,5,12:i:1,2**, Typhimurium, é chamado de *S.* Typhimurium ou *Salmonella* Typhimurium ou *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium.

Os sorotipos mais comuns. Mais de 50% dos sorotipos de *Salmonella* pertencem à *S. enterica* subsp. *enterica* e, dentre esses, os sorogrupos somáticos mais comuns são A, B, C1, C2, D, E1 e E4. Esses sorogrupos respondem por aproximadamente 99% das infecções por *Salmonella* em humanos e animais de sangue quente, incluindo sorotipos amplamente conhecidos como Paratyphi A (Grupo A), Paratyphi B e Typhimurium (Grupo B), Paratyphi C e Choleraesuis (Grupo C), Typhi, Enteritidis e Gallinarum (Grupo D). Os fatores antigênicos encontrados nesses sorogrupos somáticos encontram-se descritos no Quadro 19.2.

Quadro 19.2. Fórmulas antigênicas (antígenos O e Vi) presentes nos sorogrupos somáticos mais freqüentemente implicados em salmoneloses (Popoff & Le Minor, 2005).

Sorogrupo somático	A (O:2)	B (O:4)	C1 (O:7)	C2/C3 (O:8)	D1 (O:9)	D2 (O:9,46)	D3 (O:9,46,27)	E1/E2/E3 (O:3,10)	E4 (O:1,3,19)
Fórmulas encontradas (antígenos O)[a]	2,12 1,2,12	4,12 1,4,12 4,5,12 4,[5],12 4,12,27 1,4,[5],12 1,4,12,27 4,[5],12,27 1,4,[5],12,27	6,7 6,7,14 6,7,[Vi][b]	8 6,8 8,20 6,8,20	9,12 1,9,12 9,12,[Vi][c] 1,9,12,[Vi][d]	9,46	9,12,46,27 1,9,12,46,27	3,10 3,10,[15] 3,10, [15,34] 3,10,[15], [15,34]	1,3,19 1,3,10,19 1,3,15,19

[a] Os fatores entre parênteses podem estar presentes ou não. Os fatores sublinhados são originados por conversão fágica.
[b] Sorotipo Pratyphi C, [c] Sorotipo Typhi, [d] Sorotipo Dublin

Características bioquímicas de *Salmonella*

As informações apresentadas abaixo são da ICMSF (1996) e da 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Popoff & Le Minor, 2005)

As principais características bioquímicas das espécies e subspécies de *Salmonella* e de alguns sorotipos importantes encontram-se sumariadas no Quadro 19.3. As salmonelas, como todas as

Enterobacteriaceae, são oxidase negativas. Também não produzem butilenoglicol (Voges-Proskauer negativas) nem fenilalanina deaminase. Normalmente são móveis, mas as cepas dos sorotipos Gallinarum e Pullorum, ao contrário, usualmente são imóveis. Reduzem nitrato a nitrito (exceto 2% das cepas do sorotipo Choleraesuis) e são VM (vermelho de metila) positivas (exceto 9% das cepas do sorotipo Pullorum). Normalmente produzem gás a partir de glicose, mas as cepas dos sorotipos Typhi e Gallinarum são negativas. A temperatura de crescimento varia entre 5-7 e 46°C, com ótima entre 35 e 43°C. O pH de crescimento varia entre 3,8 e 9,5, com ótimo entre 7,0 e 7,5. A atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (ICMSF, 1996).

Quadro 19.3. Principais características das espécies de *Salmonella* e de alguns sorotipos importantes epidemiologicamente (Popoff & Le Minor, 2005).

Teste	*S. enterica* subsp. *enterica*	*Salmonella* serovar Choleraesuis	*Salmonella* serovar Gallinarum	*Salmonella* serovar Paratyphi A	*Salmonella* serovar Pullorum	*Salmonella* serovar Typhi	*S. enterica* subsp. *arizonae*	*S. enterica* subsp. *diarizonae*	*S. enterica* subsp. *houtenae*	*S. enterica* subsp. *indica*	*S. enterica* subsp. *salamae*	*S. bongori*
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose acido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose gás	+ (96)	+ (95)	-	+ (99)	+ (90)	-	+ (99)	+ (99)	+	+	+	+ (94)
Lactose	- (99)	-	-	-	-	- (99)	- (85)	+ (85)	-	- (78)	- (99)	-
Sacarose	- (99)	-	-	-	-	-	- (99)	- (95)	-	-	- (99)	-
H_2S	+ (95)	+/- (50/50)	+	- (90)	+ (90)	+ (97)	+ (99)	+ (99)	+	+	+	+
Lisina	+ (98)	+ (95)	+ (90)	-	+	+ (98)	+ (99)	+ (99)	+	+	+	+
Urease	- (99)	-	-	-	-	-	-	-	- (98)	-	-	-
Dulcitol	+ (96)	- (95)	+ (90)	+ (90)	-	-	-	- (99)	-	+ (67)	+ (90)	+ (94)
KCN	-	-	-	-	-	-	- (99)	- (99)	+ (95)	-	-	+
Malonato	-	-	-	-	-	-	+ (95)	+ (95)	-	-	+ (95)	-
Indol	- (99)	-	-	-	-	-	- (99)	- (98)	-	-	- (98)	-
VM	+	+	+	+	+ (90)	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+ (95)	- (75)	-	-	-	-	+ (99)	+ (98)	+ (98)	+ (89)	+	+ (94)
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+ (95)	+ (95)	-	+ (95)	-	+ (97)	+ (99)	+ (99)	+ (98)	+	+ (98)	+
Nitrato	+	+ (98)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	- (98)	-	-	-	-	-	+	+ (92)	-	- (56)	- (85)	+ (94)

\+ = 100% das cepas são positivas, exceto quando outra porcentagem estiver especificada entre parênteses.
\- = 100% das cepas são negativas, exceto quando outra porcentagem estiver especificada entre parênteses.

As cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* são o principal alvo das análises em alimentos e seu perfil bioquímico é o que, normalmente, se considera como típico nos ensaios de detecção.

a) Fermentam a glicose com produção de ácido (100% das cepas) e gás (96% das cepas)
b) Não fermentam a lactose e a sacarose (99% das cepas).
c) Descarboxilam a lisina (98% das cepas) com exceção do sorotipo Paratyphi A (100% das cepas negativas).
d) Produzem H_2S (95% das cepas), com exceção dos sorotipos Paratyphi A (90% das cepas negativas) e Choleraesuis (50% das cepas negativas).
e) Não produzem urease (99% das cepas).
f) Fermentam o dulcitol (96% das cepas), com exceção dos sorotipos Typhi (100% das cepas negativas), Pullorum (100% das cepas negativas) e Choleraesuis (95% das cepas negativas).

g) Não crescem na presença de KCN (100% das cepas).
h) Não utilizam o malonato (100% das cepas).
i) Utilizam o citrato (95% das cepas), com exceção dos sorotipos Typhi, Paratyphi A, Pullorum Gallinarum (100% das cepas negativas) e Choleraesuis (75% das cepas negativas).
j) Não produzem indol (99% das cepas).
k) Não produzem a enzima β-galactosidase, com teste de ONPG (Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo) negativo (98% das cepas).

Epidemiologia

As informações abaixo são do *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook* "*Bad Bug Book*" da Food and Drug Administration (FDA/CFSAN, 2005) e do *Fact Sheet N° 139* da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005).

O principal habitat das salmonelas é o trato intestinal de humanos e animais. Alguns poucos sorotipos são restritos a um hospedeiro, como *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A e C e *Salmonella* Sendai em humanos, *Salmonella* Abortusovis em ovinos, *Salmonella* Abortusequi em equinos, *Salmonella* Gallinarum em aves, *Salmonella* Typhisuis em suínos, *Salmonella* Choleraesuis em suínos (mais raramente, em humanos) e *Salmonella* Dublin em bovinos (mais raramente, em humanos e ovinos) (Ellermeier & Slauch, 2005). Quando esses sorotipos provocam doenças em humanos, o processo geralmente é invasivo e apresenta risco de vida.

A maioria dos sorotipos, entretanto, têm um espectro de hospedeiros amplo e, tipicamente, provocam gastroenterites sem complicações e sem necessidade de tratamento. Em crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado ou comprometido, ao contrário, essas infecções podem ser severas. Os sorotipos mais importantes na transmissão dessas salmoneloses de animais para humanos são *Salmonella* Enteriditis e *Salmonella* Typhimurium.

Salmonella Typhi e Paratyphi provocam septicemia e febre tifóide ou paratifóide em humanos e a septicemia tem sido associada com infecções subsequentes em praticamente todos os órgãos. Artrite pós enterite e síndrome de Reiter também têm sido relatadas, geralmente ocorrendo depois de três semanas. A artrite reativa pode atingir 2% dos casos e o tratamento é difícil.

Nas gastroenterites provocadas pelas outras salmonelas, os sintomas ocorrem entre seis e 48 horas, incluindo febre, dor de cabeça, cólicas abdominais, diarréia, náusea e às vezes vômito. A duração é de um a dois dias, podendo prolongar-se dependendo do hospedeiro, da dose ingerida e da cepa de *Salmonella* envolvida. A dose infectiva é de 15 a 20 células e pode atingir grupos de qualquer faixa etária. Idosos e crianças podem sofrer desidratação severa, com risco de vida. Pacientes de AIDS são atingidos por salmoneloses com uma frequência 20 vezes maior do que a população em geral, sofrendo de episódios recorrentes. Em 80% dos casos, as salmoneloses ocorrem individualmente e não em surtos explosivos.

Complicações decorrentes das salmoneloses não são incomuns e, no caso das febres tifóide e paratifóide, pode atingir vários órgãos, provocando lesões. A taxa de mortalidade da febre tifóide é de 10% e a das demais salmoneloses geralmente é de menos de 1%. A septicemia provocada pelo sorotipo Dublin em idosos pode apresentar uma taxa de mortalidade de 15%. O sorotipo Enteritidis tem apresentado taxa de mortalidade de 3,6%, atingindo principalmente idosos.

Salmonella é uma bactéria de ampla ocorrência em animais e, no ambiente, as principais fontes são a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas. A doença geralmente é contraída através do consumo de alimentos contaminados de origem animal, principalmente a carne bovina, a carne de aves, os ovos e o

leite. Os vegetais contaminados com esterco também têm sido implicados na transmissão. A bactéria atinge toda a cadeia de produção de alimentos, a partir dos produtos primários, já tendo sido implicados em salmoneloses os pescados, os produtos de confeitaria recheados com cremes, a gelatina desidratada, o cacau e o chocolate, o coco e os molhos e coberturas para saladas não industrializados e preparados com ovos crus.

Métodos tradicionais de análise de *Salmonella*

A técnica tradicional de detecção de *Salmonella* em alimentos é um método cultural clássico de presença/ausência, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações extremamente desfavoráveis. Esse é o caso de alimentos com uma microbiota competidora muito maior do que a população de *Salmonella* e/ou alimentos em que as células de *Salmonella* se encontrem em número muito reduzido e/ou alimentos em que as células se encontrem injuriadas pelo processo de preservação (aplicação de calor, congelamento, secagem). Os procedimentos recomendados por diferentes órgãos reguladores, embora apresentem algumas variações na seleção dos meios de cultura e forma de preparação das amostras, segue basicamente quatro etapas que podem ser aplicadas a qualquer tipo de alimento. Essas etapas e os meios utilizados pelos diferentes órgãos reguladores internacionais encontram-se sumariados no Quadro 19.4.

Quadro 19.4. Meios e condições de incubação recomendados pela ISO, FDA e USDA nas diversas etapas do ensaio de *Salmonella* em alimentos.

Método[a]	Pré enriquecimento[b]	Enriquecimento seletivo[b]	Plaqueamento diferencial[b]
ISO 6579 (2007)	BPW a 37±1ºC/18±2h[c]	RVS a 41,5±1ºC/24±3h MKTTn a 37±1ºC/24±3h	XLD a 37±1ºC/24±3h 2º Opcional[e]
BAM/FDA (2007)	CL a 35±2ºC/24±2h[c]	RV a 42±0,2ºC/24±2h TT a 35±2ºC/24±2h ou 43±0,2ºC/24±2h[d]	HE a 35±2ºC/24±2h BS a 35±2ºC/24±2h XLD a 35±2ºC/24±2h
MLG/FSIS (2008)	BPW a 35±2ºC/18-24h	RV ou RVS a 42±0,5ºC/22-24h TTH a 42±0,5ºC/22-24h	BGS a 35±2ºC/18-24h XLT4 ou DM-LIA a 35±2ºC/18-24h

[a] **ISO 6579 (2007)** = Método da International Organization for Standardization, **BAM/FDA (2007)** = Método do *Bacteriological Analytical Manual Online* da Food and Drug Administration (Andrews & Hammack, 2007), **MLG/FSIS** = Método do *Microbiological Laboratory Guidebook Online* do Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture (MLG/FSIS, 2008).

[b] **BPW** = Água Peptonada Tamponada, **BGS** = Ágar Verde Brilhante Sulfa, **BS** = Ágar Bismuto Sulfito, **CL** = Caldo Lactosado, **DM-LIA** = Ágar Lisina Ferro Duplamente Modificado, **HE** = Ágar Entérico de Hectoen, **MKTTn** = Caldo Tetrationato Muller-Kauffmann Novobiocina, **RV** = Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado, **RVS** Caldo Rappaport-Vassiliadis Soja, = **TT** = Caldo Tetrationato, **TTH** = Caldo Tetrationato Hajna, **XLD** = Ágar Xilose Lisina Desoxicolato, **XLT4** = Ágar Xilose Lisina Tergitol 4.

[c] Há algumas variações, apresentadas na descrição do procedimento.

[d] Alimentos com baixa carga microbiana a 35ºC e com alta carga microbiana a 43ºC.

[e] Selecionar um meio adequado para o isolamento de cepas lactose positivas e dos sorotipos Typhi e Paratyphi. O Ágar Verde Brilhante (BG) e o Ágar Bismuto Sulfito (BS) podem ser utilizados.

Pré-enriquecimento em caldo não seletivo. Objetiva a recuperação de células injuriadas, conseguida incubando-se a amostra em condições não seletivas, por pelo menos 18 horas. Os meios mais utilizados são a Água Peptonada Tamponada (BPW) e o Caldo Lactosado (CL), com algumas exceções apresentadas na descrição dos procedimentos.

Enriquecimento em caldo seletivo. Objetiva inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella,* incubando-

se a amostra pré-enriquecida em caldo seletivo, por 18 a 24 horas. Nesta etapa, recomenda-se a utilização de dois diferentes meios de enriquecimento, porque a resistência de *Salmonella* aos agentes seletivos varia de cepa para cepa. Os meios mais recomendados são o Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado (RV) ou Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) e diversas formulações do Caldo Tetrationato, com algumas exceções apresentadas na descrição dos procedimentos. A seletividade do RV e do RVS é baseada na presença de verde de malaquita oxalato, na alta pressão osmótica (presença de cloreto de magnésio em alta concentração) e no pH relativamente ácido (5,1). O Caldo Tetrationato tem várias formulações comerciais, que são utilizadas por diferentes órgãos reguladores. Essas formulações são bem definidas na descrição dos procedimentos. A base da seletividade do meio é a presença de verde brilhante, bile (ou desoxicolato de sódio), iodo e tiossulfato de sódio. O iodo é adicionado no momento do uso, reagindo com o tiossulfato para formar o tetrationato. O crescimento das enterobactérias que reduzem o tetrationato, como *Salmonella*, é relativamente normal, enquanto os coliformes e outras enterobactérias não redutoras são suprimidas. A redução do tetrationato produz ácido, neutralizado pelo carbonato de cálcio presente na formulação. *Proteus* também são redutores de tetrationato e podem crescer nesse meio, interferência que pode ser reduzida com a adição de novobiocina.

Plaqueamento seletivo diferencial. Objetiva promover o desenvolvimento preferencial de colônias de *Salmonella,* com características típicas que as distingam dos competidores, para posterior confirmação sorológica e bioquímica. Assim como na etapa de enriquecimento seletivo, recomenda-se que o plaqueamento diferencial seja feito em mais de um tipo de meio de cultura, havendo diversos meios disponíveis para utilização nessa etapa. Os mais utilizados são os meios que diferenciam *Salmonella* através da não fermentação da lactose e da produção de H_2S, como o Ágar Entérico de Hectoen (HE), o Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e o Ágar Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4). Como há cepas de *Salmonella* que fermentam a lactose ou não produzem H_2S, é importante que o segundo ou o terceiro meio de plaqueamento não seja baseado nessas duas características. Uma dessas opções é o Ágar Verde Brilhante (BG), que baseia-se na fermentação da lactose mas não na produção de H_2S, e o Ágar Bismuto Sulfito (BS), que baseia-se na produção de H_2S mas não na fermentação da lactose.

Confirmação. Objetiva verificar se as colônias típicas obtidas nas placas são realmente colônias de *Salmonella*, através de provas bioquímicas e sorológicas. A confirmação bioquímica verifica o perfil bioquímico característico das cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* apresentado no Quadro 19.3. De maneira geral, os diferentes órgãos reguladores também recomendam o uso de "kits" comerciais miniaturizados, que permitem a realização de um número maior de provas bioquímicas. A confirmação sorológica verifica a presença de antígenos "O", "Vi" e "H", por testes de aglutinação com anti-soros polivalentes. Esses anti soros devem conter anticorpos para os fatores mais comumente encontrados que, no caso do teste sorológico somático, são os dos sorogrupos "A" a "E". Alguns anti-soros comerciais contém, além dos anticorpos para os fatores dos grupos "A" a "E", também para o antígeno Vi. Algumas marcas incluem um "pool"completo, com os somáticos "A" a "E", os flagelares e o Vi, juntos. Os métodos de análise de alimentos terminam a confirmação nessa etapa, porque a caracterização completa de cepas de *Salmonella* normalmente é feita por poucos laboratórios de referência em cada país.

Métodos alternativos de análise de *Salmonella*

O método tradicional é bastante sensível, com limite de detecção de uma unidade formadora de colônia/25g de amostra, porém, é lento e trabalhoso. Em função disso, há um grande interesse por métodos alternativos mais rápidos e mais simples, que possam ser utilizados em lugar do método tradicional.

Nos últimos dez anos houve um grande avanço no desenvolvimento de novos métodos, particularmente os métodos imunológicos e, em menor escala, os métodos baseados nos ácidos nucleicos. Esses métodos seguem a tendência atual de desenvolvimento de “kits” analíticos com marca registrada, definidos pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) como: “sistemas contendo todos os componentes chave para a realização da análise de um ou mais microrganismos, em um ou mais tipos de alimentos, segundo um determinado método” (Andrews, 1997). A grande vantagem dos “kits” é que o material requerido nos ensaios (todo ou parte dele) é comercializado em conjunto, eliminando a preparação no laboratório.

Já foram oficializados pela AOAC para a análise de *Salmonella* os “kits” analíticos descritos no Quadro 19.5.

Quadro 19.5. “Kits” analíticos oficializados pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para a detecção de *Salmonella* em alimentos.

Analito	Fabricante	Nome do “kit	Validação	Aplicação
Salmonella spp.	Organon Teknika	*Salmonella* Tek	AOAC Official Methods 986.35; 987.11; 993.08	alimentos
Salmonella spp.	Neogen Corporation	GENE TRAK *Salmonella* Assay	AOAC Official Method 987.10	alimentos
Salmonella spp.	BioControl Systems, Inc.	1-2 Test	AOAC Official Method 989.13	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Salmonella spp.	TECRA Diagnostics	TECRA *Salmonella* VIA	AOAC Official Methods 989.14, 998.09	alimentos e correlatos, amostras ambientais
Salmonella spp.	Neogen Corporation	GENE TRAK *Salmonella* DLP Assay	AOAC Official Method 990.13	alimentos
Salmonella spp.	BioControl Systems, Inc.	Assurance *Salmonella* EIA	AOAC Official Method 992.11	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Salmonella spp.	BioMérieux Inc.	VIDAS (SLM) Immunoassay	AOAC Official Methods 996.08, 2004.03	todos os alimentos
Salmonella spp	Rhone-Poulenc Diagnostics	LOCATE ELISA	AOAC Official Method 997.16	alimentos
Salmonella spp.	BioControl Systems, Inc.	Assurance Gold *Salmonella* EIA	AOAC Official Method 999.08	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Salmonella spp.	BioControl Systems, Inc.	VIP for *Salmonella*	AOAC Official Method 999.09	alimentos, ingredientes e amostras ambientais
Salmonella spp.	TECRA Diagnostics	TECRA *Salmonella* Unique	AOAC Official Method 2000.07	alimentos e correlatos, amostras ambientais
Salmonella spp.	BioMérieux Inc.	VIDAS Immuno-Concentration *Salmonella* (ICS)	AOAC Official Methods 2001.07, 2001.08, 2001.09	todos os alimentos
Salmonella spp.	Qualicon Inc.	Bax System	AOAC Official Method 2003.09	alimentos
Salmonella spp.	BioMérieux Inc.	VIDAS (SLM) Immunoassay	AOAC Official Method 2004.03	alimentos
Salmonella spp.	Neogen Corporation	GeneQuence *Salmonella* DNA Hybridization Method	AOAC Official Method 2007.02	aves, ovos, leite, chocolate, rações

Fonte: AOAC, 2009. Rapid Methods Adopted as AOAC Official Methods. Disponível no site <http://www.aoac.org/vmeth/oma_testkits.pdf>, acesso em 28/08/09.

Composição de amostras para a análise

Na análise de diversas unidades de amostra de lotes, havendo evidências de que a composição não afeta o resultado para aquele tipo de alimento, pode-se utilizar a prática de compor as amostras. O BAM/FDA (Andrews & Hammack, 2007) especifica que até 15 unidades de amostra podem ser compostas, com exceções apresentadas no Quadro 19.7. O MLG/FSIS (2008) e a ISO 6579 (2007) não especificam o número limite para composição de amostras. Há dois procedimentos que podem ser utilizados para composição:

Composição a seco. Consiste em coletar uma unidade analítica (geralmente de 25g) de cada uma das unidades de amostra e juntar todas as unidades analíticas numa única amostra

composta, misturando bem o conteúdo. A essa amostra composta adiciona-se o caldo de pré enriquecimento, na quantidade necessária para diluição 1:10. Esse tipo de composição é recomendado para amostras em que se espera ausência de *Salmonella* ou, em caso de presença, não seja importante determinar qual unidade de amostra está contaminada. Não é recomendada para alimentos que não permitam a obtenção de uma amostra composta homogênea.

Composição úmida. Consiste em pré enriquecer cada unidade analítica separadamente e compor os caldos de pré enriquecimento obtidos. Nesse caso, o volume de caldo de enriquecimento seletivo deve ser suficiente para manter a proporção recomendada de pré enriquecimento a ser transferido. Por exemplo, a transferência para o Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV ou RVS) é feita na proporção 0,1ml de pré enriquecimento para 10ml de RV ou RVS. Então, para compor 10 amostras, são necessários 100ml de RV ou RVS. Esse tipo de composição é recomendado para alimentos que não permitam a obtenção de uma amostra composta homogênea, na composição a seco, ou quando é importante determinar qual unidade de amostra está contaminada, em caso de presença. Nessa situação, é possível analisar individualmente cada unidade pré enriquecida, preservada sob refrigeração.

19.2. MÉTODO ISO 6579:2007(E)

Método da International Organization for Standardization, aplica-se a todos os alimentos destinados ao consumo humano, às rações animais e à amostras do ambiente de fabricação ou manipulação de alimentos. Pode não recuperar cepas dos sorotipos Typhi e Paratyphi.

19.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Água Peptonada Tamponada (BPW)
- Caldo Rappaport Vassiliadis Soja (RVS)
- Caldo Tetrationato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn)
- Placas de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD)
- Placas de um 2º meio opcional, de escolha do laboratório
- Placas de Ágar Nutriente
- Tubos de Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)
- Tubos de Ágar Uréia de Christensen
- Tubos de Caldo Descarboxilase 0,5% L-Lisina
- Tubos de Caldo Triptona 1%
- Tubos de Caldo VM-VP
- Reagente de β-galactosidase (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo - ONPG)
- Reagente de Kovacs para teste de indol
- Reagentes de Barrit para teste de VP (Solução de α-naftol 5%, Solução de KOH 40%, Creatina em cristais)
- Anti-soro somático polivalente (Poli O)
- Anti-soro flagelar polivalente (Poli H)
- Anti-soro Vi
- Estufa incubadora a 37±1°C com termômetro calibrado
- Banho a 37±1°C com termômetro calibrado
- Banho ou estufa incubadora a 41,5±1°C com termômetro calibrado

19.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema da análise de *Salmonella* pelo método ISO 6579 (2007) encontra-se descrito na Figura 19.1. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na detecção da presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Pré-enriquecimento

Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar uma porção de 25g ou 25ml da amostra em 225ml de Água Peptonada Tamponada (BPW). Incubar a 37±1ºC/18±2h.

Nota a.1) Para a composição de amostras a seco, manter a proporção 1:10 na diluição da amostra composta em BPW. Se o volume de BPW for grande, pré aquecer o caldo a 37ºC antes da inoculação.

Nota a.2) Para a análise de coco ou produtos contendo mais de 20% de coco, utilizar BPW suplementada com 50g/l de caseína (não utilizar caseína ácida) ou, na indisponibilidade da caseína, com 100g/l de leite em pó desnatado. Se for esperada uma alta contaminação da amostra por bactérias Gram positivas, incubar o caldo a 37±1ºC/2h e então adicionar 0,018g/l de verde brilhante, continuando a incubação até completar 18±2h.

Nota a.3) Para a análise de produtos ácidos, utilizar BPW em concentração dupla, para garantir que o pH não atinja valores inferiores a 4,5 durante o período de incubação.

b) Enriquecimento seletivo

Agitar cuidadosamente o frasco de pré enriquecimento (BPW) e transferir 0,1ml para 10ml de Caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS) e 1ml para 10ml de Caldo Tetrationato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn). Incubar o Caldo RVS a 41,5±1ºC/24±3h e o Caldo MKTTn a 37±1ºC/24±3h.

Nota b.1) Para a composição úmida das amostras, multiplicar o volume BPW a ser transferido pelo número de unidades de amostra compostas, na transferência para os caldos RVS e MKTTn. O volume de RVS e MKTTn também deve ser multiplicado pelo número de unidades de amostra compostas, para manter a proporção.

Nota b.2) Se a incubação for feita em banho, é recomendado o uso de um agente bactericida na água do banho. A dose infectiva de *Salmonella* é muito baixa e qualquer contaminação acidental da água pela amostra, durante a incubação, é potencialmente perigosa para o pessoal do laboratório.

c) Plaqueamento diferencial

De cada cultura em RVS, estriar uma alçada (estrias de esgotamento) em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e uma alçada em um segundo meio, de livre escolha do laboratório. Repetir esse procedimento com o caldo MKTTn. Incubar as placas de XLD invertidas, a 37±1ºC/24±3h. Incubar as placas do segundo meio opcional de acordo com a orientação do fabricante.

Nota c.1) Para selecionar o segundo meio de plaqueamento, a ISO 6579 recomenda optar por meios adequados ao isolamento de cepas lactose positivas e cepas dos sorotipos Typhi e Paratyphi. O Ágar Verde Brilhante (BG) e o Ágar Bismuto Sulfito (BS), podem ser utilizados. Seguir as orientações do fabricante para selecionar as colônias típicas no meio opcional.

Nota c.2) Para obter colônias isoladas, a ISO 6579 recomenda utilizar placas grandes (140mm de diâmetro) para as estrias de esgotamento. Na indisponibilidade dessas placas, recomenda estriar a mesma alçada em duas placas pequenas (100mm de diâmetro), sem flambar a alça entre uma placa e outra.

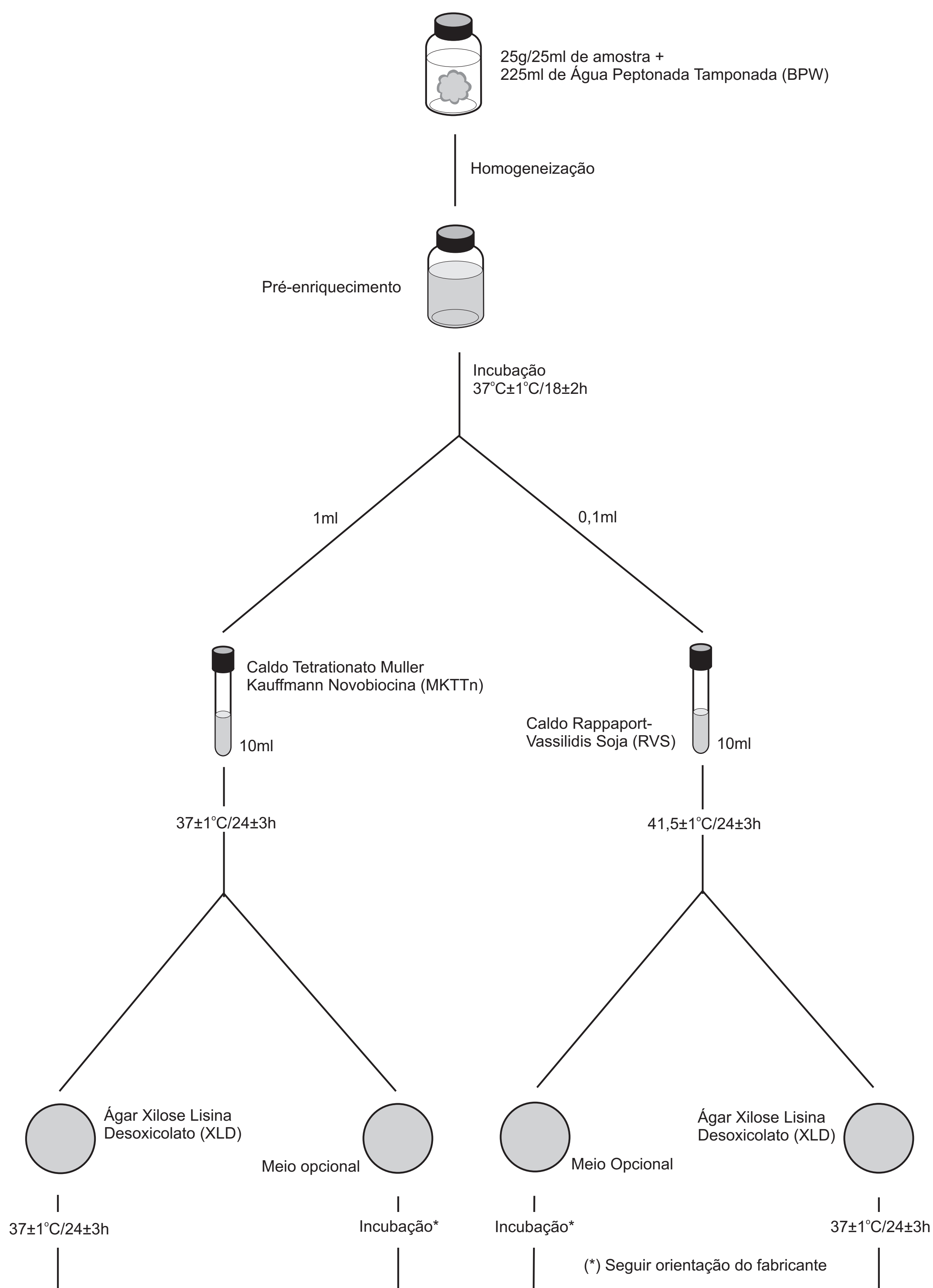


Figura 19.1. Esquema da análise de *Salmonella* pelo método ISO 6579 (2007).

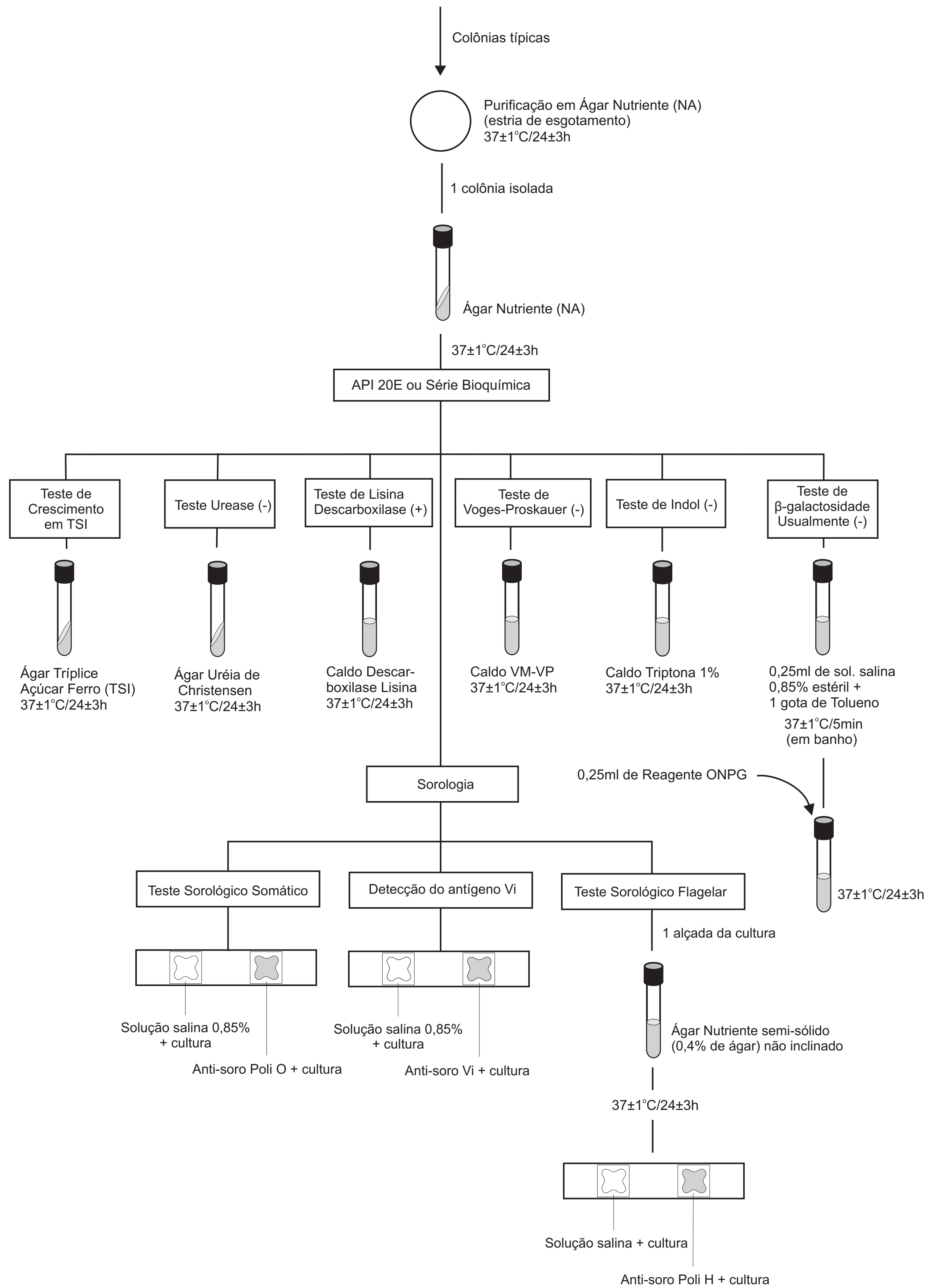


Figura 19.1. continuação.

d) Seleção das colônias e purificação das culturas para a confirmação

Após o período de incubação, verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella* nos meios de plaqueamento diferencial. No Ágar XLD as colônias de típicas são cor de rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente em redor. Cepas de *Salmonella* H_2S fortemente positivas podem produzir colônias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas. Cepas de *Salmonella* H_2S negativas produzem colônias cor de rosa com centro rosa mais escuro, mas não preto. Cepas de *Salmonella* lactose positivas produzem colônias amarelas com ou sem centro preto. No segundo meio de plaqueamento, seguir as orientações do fabricante para verificar as características típicas das colônias de *Salmonella*.

No fundo de cada placa inoculada, marcar cinco colônias típicas para a confirmação e, se houver menos de cinco, marcar todas. Selecionar uma das colônias marcadas, submeter à confirmação e, se o resultado dessa for negativo, submeter as outras à confirmação. Em estudos epidemiológicos, pelo menos cinco colônias de cada placa devem ser submetidas à confirmação.

Estriar (estrias de esgotamento) a cultura de cada colônia selecionada em uma placa de Ágar Nutriente (NA), para purificação. Incubar as placas, invertidas, a 37±1°C/24±3h. Após a incubação, selecionar uma colônia bem isolada de cada placa de NA, para a realização dos testes de confirmação.

e) Confirmação bioquímica

Para os testes bioquímicos pode ser utilizado um "kit" miniaturizado de identificação, adequado para *Enterobacteriaceae*. Alternativamente, aplicar a série bioquímica descrita abaixo.

e.1) Teste de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI). Com uma agulha de inoculação, inocular cada cultura em um tubo inclinado de TSI, por picada e estrias na rampa. Incubar os tubos a 37±1°C/24±3h, com as tampas ligeiramente afrouxadas, para manter condições aeróbicas e prevenir a excessiva produção de H_2S. Observar se há ocorrência de reação típica de *Salmonella*: rampa alcalina (vermelha), fundo ácido (amarelo) com produção de gás (bolhas ou rachaduras no meio de cultura), com ou sem produção de H_2S (escurecimento ou não do meio no fundo). Eventualmente pode crescer uma cepa lactose positiva de *Salmonella*, provocando uma reação ácida (amarela) atípica na rampa. Essas cepas não devem ser descartadas sem levar em conta os resultados dos demais testes.

e.2) Teste de urease. Inocular cada cultura em um tubo de Ágar Uréia de Christensen inclinado (estrias na rampa). Incubar os tubos a 37±1°C/24±3h e observar a ocorrência de viragem alcalina do indicador, com alteração da cor do meio de pêssego para cor de rosa escuro (teste positivo), ou permanência do meio na cor original (teste negativo). Ocasionalmente, tubos não inoculados de Ágar Uréia de Christensen podem sofrer viragem alcalina, sendo recomendável incubar um tubo não inoculado como controle negativo. A maioria das cepas de *Salmonella* são urease negativas.

e.3) Teste de lisina descarboxilase. Inocular cada cultura em um tubo de Caldo Descarboxilase 0,5% L-Lisina, logo abaixo da superfície do líquido. Incubar a 37±1°C/24±3h e observar se ocorre turvação com viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio para roxo azulado (teste positivo) ou viragem ácida para amarelo (teste negativo). A maioria das salmonelas são lisina-positivas, mas as cepas do sorotipo Paratyphi são negativas.

e.4) Teste de Voges-Proskauer. Inocular cada cultura em um tubo com 3ml de caldo VM-VP e incubar a 37±1°C/24±3h. Após a incubação, adicionar ao tubo duas gotas de solução

aquosa 0,5% de creatina monohidrato, três gotas de solução de α-naftol 5% e duas gotas de solução de KOH 40%, nesta seqüência e agitando o tubo entre um reagente e outro. O desenvolvimento de uma cor rosa escuro ou vermelha no meio de cultura, no intervalo de 15min, indica teste positivo. O não desenvolvimento da cor rosa ou vermelha indica teste negativo. As salmonelas são VP negativas.

e.5) Teste de Indol. Inocular cada cultura em um tubo com 5ml de Caldo Triptona 1% suplementado com 1g/l de DL-Triptofano e incubar a 37±1°C/24±3h. Após a incubação adicionar, para cada 5ml de cultura, 1ml do Reagente de Kovacs para teste de indol e observar se há desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo), ou se o anel permanece amarelado, cor do reagente de Kovacs (teste negativo). Desenvolvimento de vários tons entre vermelho e rosa indica teste indeterminado. A maioria das cepas de *Salmonella* são indol-negativas.

e.6) Teste de β-galactosidase. Suspender uma alçada de cada cultura em um tubo com 0,25ml de solução salina 0,85% estéril. Adicionar ao tubo uma gota de tolueno, agitar bem e incubar em banho a 37±1°C/5min. Adicionar ao tubo 0,25ml do reagente ONPG de β-galactosidase (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo), agitar bem e incubar em banho a 37±1°C/24±3h, examinando periodicamente. O desenvolvimento de uma cor amarela no líquido, geralmente no intervalo de 20min, é indicativa de teste positivo. A maioria das cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* são negativas.

Nota e.6.1) O teste pode ser realizado usando-se discos impregnados com o ONPG, disponíveis comercialmente com os seguintes códigos: Taxo™ ONPG Discs (BBL 231249), ONPG Discs (Oxoid DD013), ONPG Discs (Fluka 49940). Nesse caso, deve ser seguida a orientação do fabricante para a realização do teste.

f) Confirmação sorológica

f.1) Detecção dos antígenos somáticos (poli O). Marcar dois quadrados de aproximadamente $2cm^2$ em uma lâmina de vidro, usando um lápis de marcar vidro de material hidrofóbico. Colocar uma gota de solução salina 0,85% estéril em um dos quadrados e uma gota de anti-soro somático polivalente anti-*Salmonella* no outro. Emulsionar uma parte da colônia suspeita na gota de solução salina e outra parte na gota de anti-soro. Segurando a lâmina contra um fundo preto bem iluminado, fazer delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina, para movimentar a emulsão, observando se ocorre aglutinação no quadrado com o anti-soro. Comparar com a aparência da emulsão no quadrado com salina (controle negativo), para não confundir a aparência turva da emulsão com reação de aglutinação. Eventualmente pode ocorrer aglutinação em ambos os quadrados, indicação de que a cepa é auto-aglutinante. Essas cepas não precisam ser submetidas a outros testes sorológicos.

Nota f.1) Os anti-soros somáticos polivalentes devem conter, no mínimo, anticorpos para os fatores antigênicos dos grupos sorológicos somáticos "A" até "E", descritos no Quadro 19.2. De preferência, devem conter também anticorpos para o antígeno capsular Vi que, se presente, vai encobrir os antígenos somáticos. Na aquisição de marcas comerciais, escolher fornecedores que discriminem os fatores detectados pelo "pool" de anticorpos presentes. Por exemplo: o Soro *Salmonella* Polivalente Somático da Probac do Brasil (São Paulo) discrimina anticorpos para o Vi e para os fatores dos sorogrupos A, B, C1, C2, D,

E1, E2, E3 e E4 e o soro da Becton Dikinson (BD Difco 222641) discrimina anticorpos para o Vi e para os fatores dos sorogrupos somáticos A até I (O:1 a O:16, O:19, O:22 a O:25 e O:34).

f.2) Detecção do antígeno Vi. O procedimento é o mesmo descrito para os antígenos somáticos, substituindo o anti-soro polivalente somático pelo Vi.

Nota f.2) Alguns anti-soros polivalentes já incluem o Vi junto com os somáticos, não sendo necessário testar separadamente.

f.3) Detecção dos antígenos flagelares (poli H). Inocular cada cultura em um tubo de Ágar Nutriente semi sólido (0,4% de ágar) não inclinado e incubar a 37±1°C/24±3h. A partir dessa cultura, realizar o teste de aglutinação em lâmina, da mesma forma descrita para o teste sorológico somático, substituindo o anti-soro somático pelo anti-soro flagelar polivalente anti-*Salmonella*.

Nota f.3) Alguns anti-soros polivalentes incluem os flagelares junto com os somáticos, mas o teste descrito pela ISO deve ser feito separadamente, porque é precedido do cultivo da cultura em meio semi-sólido (enriquecimento de flagelos).

g) Interpretação dos resultados

Interpretar os resultados de acordo com a orientação do Quadro 19.6.

Quadro 19.6. Interpretação dos testes de confirmação no ensaio de *Salmonella* pelo método ISO 6579 (2007).

<table>
<tr><th>Resultados dos testes bioquímicos</th><th>Auto aglutinação</th><th>Resultados dos testes sorológicos</th><th>Interpretação</th></tr>
<tr><td>Típicos[a]</td><td>Não</td><td>“O”, “Vi” ou “H” positivos</td><td>Confirmada como Salmonella</td></tr>
<tr><td>Típicos[a]</td><td>Não</td><td>todos negativos</td><td rowspan="3">Pode ser Salmonella[b]</td></tr>
<tr><td>Típicos[a]</td><td>Sim</td><td>Não se aplica</td></tr>
<tr><td>Atípicos</td><td>Não/Sim</td><td>“O”, “Vi” ou “H” positivos</td></tr>
<tr><td>Atípicos</td><td>Não/Sim</td><td>todos negativos</td><td>Não confirmada como Salmonella</td></tr>
</table>

a Resultados típicos: TSI com rampa alcalina, fundo ácido, produção de gás e produção de H_2S, urease negativo, lisina descarboxilase positivo, β-galactosidase negativo, VP negativo, indol negativo.

b Essas cepas devem ser enviadas a um laboratório apto à realização da confirmação definitiva.

19.3. MÉTODO BAM/FDA (2007)

Método da Food and Drug Administration (FDA), revisão de dezembro de 2007 do Capítulo 5 do *Bacteriological Analytical Manual Online* (Andrews & Hammack, 2007), disponível no site da FDA<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>, acessado em 30/10/2009.

O método da FDA é aplicável a todos os alimentos, contendo descrição detalhada de variações no procedimento para alguns produtos em particular (tipo de caldo, forma de homogeneização, diluição inicial). Essas variações são apresentadas no Quadro 19.7 e em notas ao longo do texto, que devem ser consultadas.

19.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Caldo de pré enriquecimento (depende da amostra, vide Quadro 19.7)
- Solução de NaOH ou HCl 1N para ajuste do pH

- Caldo Rappaport-Vassilidis Modificado (RV)
- Caldo Tetrationato (TT)
- Caldo Selenito Cistina (SC) (para a análise de goma guar ou alimentos suspeitos de contaminação com *Salmonella* Typhi)
- Ágar Entérico de Hectoen (HE)
- Ágar Bismuto Sulfito (BS)
- Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD)
- Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)
- Ágar Lisina Ferro (LIA)
- Solução Salina Formalinizada (Formalina)
- Anti-soro flagelar polivalente anti-*Salmonella*
- Anti-soro Spicer-Edwards flagelar
- Anti-soro somático polivalente anti-*Salmonella*
- "Kits" de identificação: API 20E (BioMeriéux Vitek) ou Vitek GNI (BioMeriéux Vitek) ou Enterotube II (Beckton Dicson) ou *Enterobacteriaceae* II (Beckton Dicson) ou Micro ID (Remel)
- Meios e reagentes para provas bioquímicas (se não for usado um "kit")
    - Caldo Uréia de Rustigian & Stuart ou Caldo Uréia Rápido
    - Caldo Descarboxilase de Falkow (com 0,5% de L-Lisina)
    - Caldo Vermelho de Fenol Base ou Caldo Púrpura Base com 0,5% de dulcitol (com tubo de Durhan)
    - Caldo Vermelho de Fenol Base ou Caldo Púrpura Base com 0,5% de lactose (com tubo de Durhan)
    - Caldo Vermelho de Fenol Base ou Caldo Púrpura Base com 0,5% de sacarose (com tubo de Durhan)
    - Caldo Triptona 1%
    - Caldo Cianeto de Potássio com tampa de rolha recobertas de parafina
    - Caldo Malonato Modificado
    - Caldo Tripticase de Soja (TSB) ou Caldo Brain Heart Infusion (BHI)
    - Ágar Citrato de Simmons
    - Reagente de Kovacs para teste de indol
    - Reagentes de Barrit para teste de VP (solução de α-naftol 5%, solução de KOH 40%, cristais de creatina)
    - Solução de vermelho de metila
- Banho com circulação forçada a 42±0,2°C com termômetro calibrado
- Banho com circulação forçada a 43±0,2°C com termômetro calibrado
- Estufa incubadora a 35±2°C com termômetro calibrado
- Estufa incubadora a 37±0,5°C com termômetro calibrado
- Banho a 48-50°C

19.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema da análise de *Salmonella* pelo método BAM/FDA (2007) encontra-se descrito na Figura 19.2. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na detecção da presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Pré-enriquecimento

Seguindo as orientações do Capítulo 2, transferir uma porção de 25g ou 25ml da amostra para um frasco ou bolsa de homogeneização estéril, adicionar 225ml de caldo de pré-enriquecimento e homogeneizar a amostra. Seguir as instruções do Quadro 19.7 e das notas abaixo para a seleção do caldo, eventuais variações na diluição inicial e procedimento subseqüente. Se for utilizada composição de amostras a seco, manter a proporção 1:10 na diluição da amostra composta no Caldo de enriquecimento. Fechar bem o frasco e deixar descansar por 60±5min à temperatura ambiente. Agitar bem, retirar uma alíquota de volume conhecido e verificar o pH. Se necessário, ajustar em 6,8±0,2 com NaOH ou HCl 1N, verificando o volume de ácido ou base consumido na alíquota e adicionando à amostra um volume proporcional da solução estéril. Incubar os frascos a 35±2°C/24±2h, com a tampa ligeiramente afrouxada.

Nota a.1) Para a análise de alimentos congelados, recomenda-se não descongelar a amostra antes do pré enriquecimento, para prevenir injúria às células de *Salmonella* e reduzir a multiplicação de competidores. Se não for possível retirar a unidade analítica sem descongelar, uma quantidade adequada da amostra deve ser descongelada em banho, sob agitação, com temperatura abaixo de 45ºC por não mais do que 15min. Alternativamente, descongelar em geladeira (2 a 5ºC) por 18h.

Nota a.2) Para a análise de alimentos em pó com baixa solubilidade (misturas para preparo de sopas, ovo em pó, etc.), recomenda-se adicionar o caldo de enriquecimento gradualmente e com constante agitação, para evitar a formação de grumos. Adicionar às 25g da amostra um pequeno volume inicial do caldo (15-20ml) e recorrer ao auxílio de uma bagueta ou de um agitador magnético, para facilitar a homogeneização, esterilizando previamente a bagueta ou a barra magnética. Sempre sob agitação, adicionar mais 10ml do caldo e repetir esse procedimento uma terceira vez. Adicionar então o volume remanescente do caldo e manter a agitação até obter uma suspensão homogênea.

Nota a.3) Para a análise de leite em pó, recomenda-se adicionar a amostra ao caldo de enriquecimento em pequenas porções, cada porção espalhada em camadas finas sobre a superfície do líquido, sem agitação, até que seja totalmente absorvida. Após o descanso de 60±5min, não agitar nem ajustar o pH para a incubação.

Nota a.4) Para a análise do conteúdo interno de ovos "in natura", recomenda-se lavar os ovos com água, usando uma escova para remover qualquer material aderido à casca. Mergulhar e manter por 10s em uma solução de álcool iodado 3:1. Assepticamente, quebrar a casca, transferir o conteúdo interno para um frasco ou bolsa plástica estéril, homogeneizar bem e incubar a 20-24º/96 ± 2h. Após a incubação, retirar a unidade analítica de 25g. Ovos cozidos com a casca intacta devem ser desinfetados e preparados da mesma forma.

Nota a.5) Para a análise de corantes e coloríficos há dois procedimentos: Corantes cuja solução aquosa a 10% apresentem pH maior ou igual a 6,0 podem ser analisados da forma normal. Para corantes cuja solução aquosa a 10% apresente pH menor que 6,0, a etapa de pré enriquecimento pode ser suprimida, adicionando-se 25g da amostra diretamente em 225ml de Caldo Tetrationato (TT) não suplementado com Verde Brilhante. Misturar bem, deixar descansar por uma hora à temperatura ambiente, agitar e retirar uma alíquota de volume conhecido para verificar o pH. Se necessário, acertar em 6,8±0,2 e adicionar 2,25ml de uma solução de Verde Brilhante 0,1%. Agitar e incubar a 35±2°C/24±2h com a tampa do frasco ligeiramente afrouxada. Essa etapa corresponde ao enriquecimento seletivo, seguindo-se então para o plaqueamento seletivo diferencial.

Nota a.6) Para a análise de gelatina deve-se pesar 25g da amostra e adicionar 225ml de Caldo Lactosado e 5ml de uma solução aquosa de papaína a 5% (5g de papaina em 95ml de água destilada estéril). Homogeneizar em stomacher ou por agitação, fechar bem o

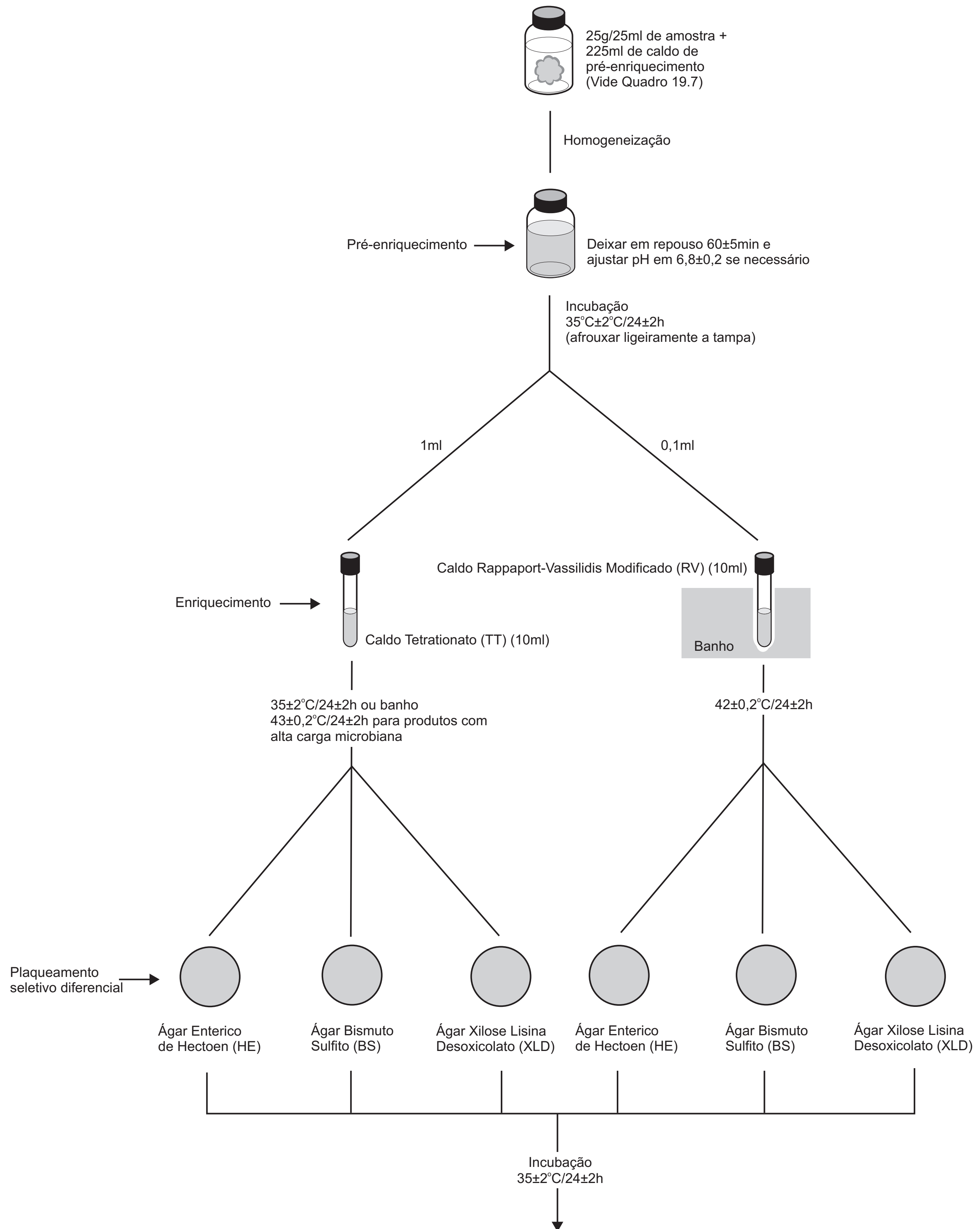


Figura 19.2. Esquema da análise de *Salmonella* pelo método BAM/FDA (2007).

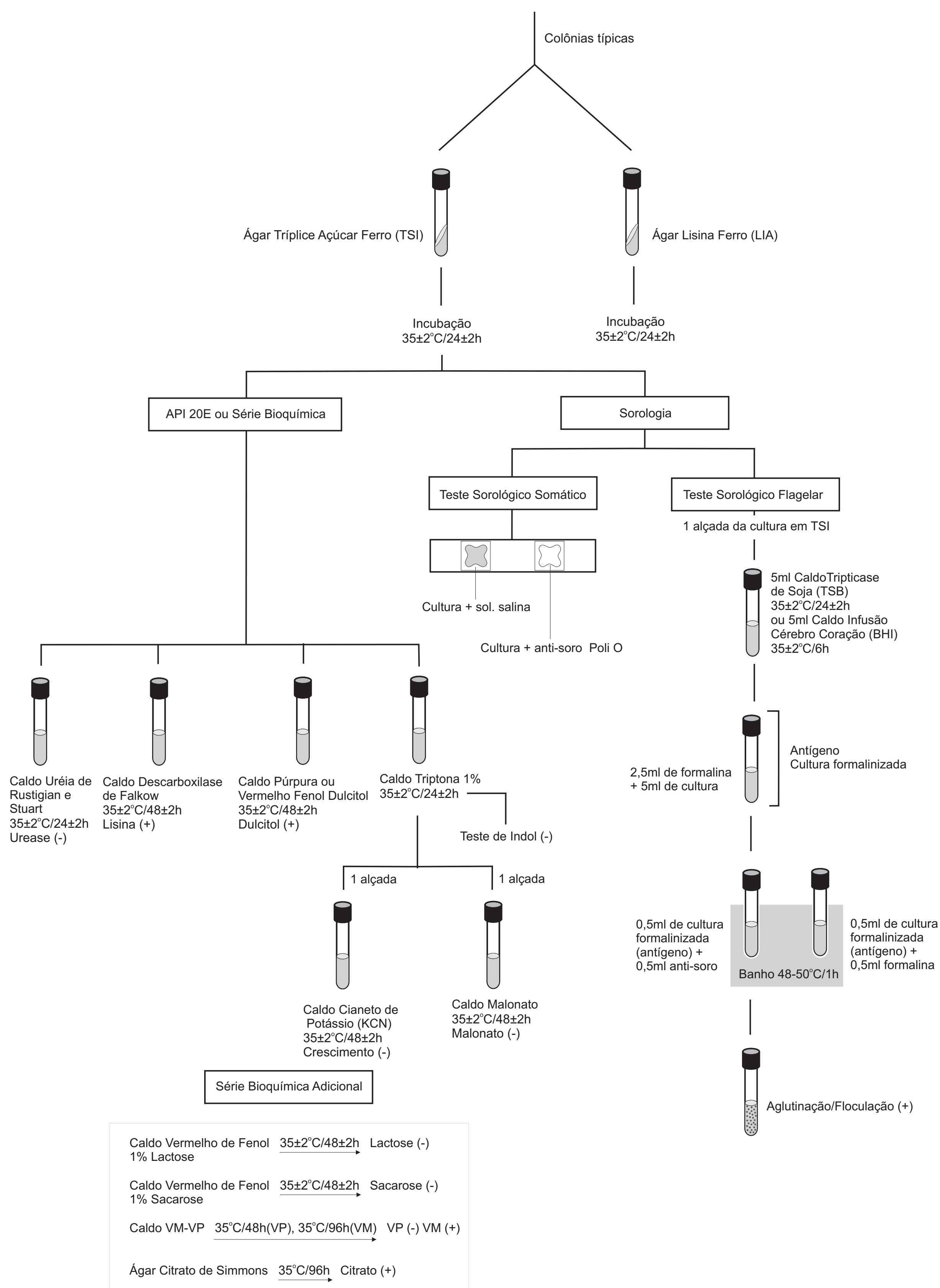


Figura 19.2. continuação.

frasco e incubar a 35±2ºC/60±5min. Agitar bem, ajustar o pH em 6,8±0,2 e incubar a 35ºC/24±2h, com a tampa do frasco ligeiramente afrouxada.

Nota a.7) Para a análise de goma guar, adicionar 225ml de Caldo Lactosado e 2,25ml de uma solução aquosa de celulase a 1% (1g de celulase em 99ml de água destilada estéril, esterilizada por filtração) em um frasco estéril. Colocar o caldo em um agitador magnético (esterilizar antes a barra magnética) e adicionar 25g da amostra ao caldo, sob constante e vigorosa agitação. Fechar bem o frasco e deixar descansar por 60±5min à temperatura ambiente. Em seguida incubar a 35±2ºC/24±2h com a tampa do frasco ligeiramente afrouxada, não sendo necessário o ajuste do pH.

Nota a.8) Para análise de carcaças de coelhos, transferir a carcaça para um saco plástico estéril tarado e pesar. Adicionar Caldo Lactosado na quantidade requerida para diluição 1:10. Agitar bem, deixar descansar por 60±5min à temperatura ambiente e ajustar o pH em 6,8±0,2, se necessário. Incubar a 35±2ºC/24±2h.

Nota a.9) Para a análise de melões e tomates inteiros, mergulhar a fruta em Caldo de Pré Enriquecimento Universal (UP), na quantidade necessária para a fruta flutuar (aproximadamente 1,5 vezes o peso da fruta, no caso dos melões, ou uma vez o peso dos tomates). Sem agitar, deixar descansar por por 60±5min à temperatura ambiente e, sem ajustar o pH, incubar a 35±2ºC/24±2h.

Nota a.10) Para a análise de mangas inteiras, mergulhar a fruta em Água Peptonada Tamponada (BPW), na quantidade necessária para a fruta flutuar (aproximadamente uma vez o peso da fruta). Sem agitar, deixar descansar por 60±5min à temperatura ambiente, ajustar o pH em 6,8±0,2 (se necessário) e incubar a 35±2ºC/24±2h.

Nota a.11) Para a análise de amostras ambientais ("swabs" e esponjas), assim que for feita a coleta mergulhar em Caldo Dey-Engley (DE), na quantidade necessária para cobrir o "swab" ou a esponja. Transportar em caixa de isopor com gelo em gel ou gelo comum contido em bolsas plásticas, para evitar o acúmulo de água nas caixas. Estocar sob refrigeração (4±2ºC) até o momento da análise, que deve ser feita dentro de 48 horas. Para o ensaio, transferir o "swab" ou a esponja para um frasco com 225ml de Caldo Lactosado (CL), agitar e deixar descansar por 60±5min à temperatura ambiente. Agitar bem, ajustar o pH em 6,8±0,2 (se necessário) e incubar a 35±2ºC/24±2h.

Nota a.12) Para a análise de polpa de mamei, homogeneizar 25g da amostra com 225ml de Caldo de Pré Enriquecimento Universal. Deixar descansar por 60±5min à temperatura ambiente. Em seguida incubar a 35±2ºC/24±2h com a tampa do frasco ligeiramente afrouxada, sem ajustar o pH. Se houver suspeita de contaminação da amostra com *Salmonella* Typhi, preparar o Caldo de Pré Enriquecimento Universal sem o citrato férrico amoniacal. Tratar essas amostras como produtos de baixa carga microbiana.

b) Enriquecimento seletivo

Agitar cuidadosamente o frasco com o caldo de pré-enriquecimento e transferir 0,1ml para 10ml de Caldo Rappaport-Vassilidis Modificado (RV) e 1ml para 10ml de Caldo Tetrationato (TT). Incubar o RV a 42±0,2ºC/24±2h (em banho com circulação forçada) e o TT a 35±2ºC/24±2h (produtos com baixa carga microbiana) ou 43±0,2ºC/24±2h em banho com circulação forçada (produtos com alta carga microbiana).

Nota b.1) No caso de goma guar ou alimentos suspeitos de contaminação com *Salmonella* Typhi, transferir 1ml do caldo de pré-enriquecimento para 10ml de Caldo Selenito Cistina (SC) e 1ml para 10ml de Caldo Tetrationato (TT). Incubar os dois caldos a 35±2ºC/24±2h.

Quadro 19.7. Orientações para a seleção do caldo de pré enriquecimento, diluição e eventuais variações no pré enriquecimento de alimentos para análise de *Salmonella* pelo método BAM/FDA (Andrews & Hammack, 2007).

Amostra	Caldo de Pré Enriquecimento	Variações no procedimento
Alimentos em geral (25g ou ml)	225ml de Caldo Lactosado (CL)	
Balas, confeitos, coberturas para confeitos (25g)	225ml de Leite em Pó Desnatado reconstituído suplementado com 0,45ml de solução de Verde Brilhante 1% após o descanso de 60min e ajuste do pH	
Carne, subprodutos de carne, substâncias animais, produtos glandulares em pedaços (25g)	225ml de Caldo Lactosado (CL) suplementado com 2,25ml de Tergitol 7 aniônico ou 2-3 gotas de Triton X-100 estéril, após o descanso de 60min e ajuste do pH	
Caseína láctica (25g)	225ml de Caldo de Pré Enriquecimento Universal	2, 3
Caseína de renina (25g)	225ml de Caldo Lactosado (CL)	2, 3
Caseinato de sódio (25g)	225ml de Caldo Lactosado (CL)	
Chocolate (25g)	225ml de Leite em Pó Desnatado reconstituído suplementado com 0,45ml de solução de Verde Brilhante 1% estéril, após o descanso de 60min e ajuste do pH	
Coco ralado ou leite de coco (25g)	225ml de Caldo Lactosado (CL) suplementado com 2,25ml de Tergitol 7 aniônico ou 2-3 gotas de Triton X-100 estéril, após o descanso de 60min e ajuste do pH	
Condimentos e vegetais em pó ou flocos (pimenta-do-reino, pimenta branca, pimenta malagueta em pó, cominho, páprica, salsa em flocos, alecrim, sementes de gergelim, tomilho, aipo em sementes, pó ou flocos) (25g)	225ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB)	
Condimentos (alho e cebola em pó ou em flocos) (25g)	225ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB) suplementado com K_2SO_3 (5g/l)	
Condimentos (pimenta da Jamaica, canela e orégano)	Caldo Tripticase de Soja (TSB) na quantidade necessária para diluição 1:100	
Condimentos (cravo da Índia)	Caldo Tripticase de Soja (TSB) na quantidade necessária para diluição 1:1000	
Outros condimentos em folha	Caldo Tripticase de Soja (TSB) na quantidade necessária para hidratar as folhas (diluição > 1:10)	
Corantes e coloríficos com pH maior ou igual a 6,0 em solução aquosa 10%	225ml de Caldo Lactosado (CL)	1
Corantes e coloríficos com pH menor que 6,0 em solução aquosa 10%	Passar diretamente ao meio de enriquecimento seletivo - 225ml de Caldo Tetrationato (sem verde brilhante)	1, 4
Farinha de soja (25g)	225ml de Caldo Lactosado (CL)	2, 3, 8
Gelatina (25g)	225ml de Caldo Lactosado (CL) suplementado com 5ml de solução de papaína 5%, adicionada no momento da homogeneização	5
Glacês e outras coberturas para produtos de confeitaria (25g)	225ml de Caldo Nutriente	
Goma guar (25g)	225ml de Caldo Lactosado (CL) suplementado com 2,25ml de solução de celulase 1%, adicionada no momento da homogeneização, que deve ser feita com agitador magnético	
Leite líquido (25ml)	225ml de Caldo Lactosado (CL)	
Leite em pó desnatado instantâneo (25g)	225ml de Água Verde Brilhante	2, 3
Leite em pó desnatado ou integral não instantâneo (25g)	225ml de Água Verde Brilhante	2, 3, 8
Levedura seca ativa ou inativa (25g)	225ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB), agitando até obter uma suspensão homogênea	
Ovos "in natura" (25g)	225ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB) suplementado com sulfato ferroso (35mg/l)	6
Ovos cozidos (25g)	225ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB)	7
Ovo líquido integral homogeneizado (25g)	225ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB) suplementado com sulfato ferroso (35mg/l)	
Ovo em pó (25g)	225ml de Caldo Lactosado (CL)	1
Suco de laranja, suco de maçã, melão descascado em pedaços (25g ou ml)	225ml de Caldo de Pré Enriquecimento Universal	3
Mangas descascadas em pedaços, tomates em pedaços (25g)	225ml de Água Peptonada Tamponada (BPW)	
"Swabs" e esponjas	225ml de Caldo Lactosado	
Polpa de mamei (25g)	225ml de Caldo de Pré Enriquecimento Universal (se houver suspeita de presença de *Salmonella* Typhi, preparar o caldo sem citrato férrico amoniacal)	3

1. Adicionar o caldo de enriquecimento gradualmente e com constante agitação, para evitar a formação de grumos. Adicionar às 25g da amostra um pequeno volume inicial do caldo (15-20ml) e recorrer ao auxílio de uma bagueta ou de um agitador magnético, para facilitar a homogeneização (esterilizando previamente a bagueta ou a barra magnética). Sempre sob agitação, adicionar mais 10ml do caldo e repetir esse procedimento uma terceira vez. Adicionar então o volume remanescente do caldo e manter a agitação até obter uma suspensão homogênea.
2. Adicionar a amostra ao caldo de enriquecimento em pequenas porções, cada porção espalhada em camadas finas sobre a superfície do líquido, sem agitação, até seja totalmente absorvida.
3. Não ajustar o pH nem agitar após o descanso de 60min.
4. Após a homogeneização da amostra, deixar descansar por 60+5min à temperatura ambiente, ajustar o pH em 6,8+0,2 e adicionar 2,25ml de uma soluçãode verde brilhante 0,1%. Incubar a 35+2°C/24+2h e passar diretamente ao plaqueamento diferencial.
5. O descanso de 60min deve ser feito a 30°C.
6. Descontaminar a casca em uma solução de álcool iodado 3:1
7. Descontaminar a casca em uma solução de álcool iodado 3:1, se estiver intacta.
8. Para esse produto não deve ser feita a composição a seco.

Nota b.2) Há várias formulações do Caldo Tetrationato disponíveis no mercado. A formulação descrita no método da FDA é a de Mueller modificada por Kauffmann, disponível comercialmente com os seguintes códigos: Tetrathionate Broth Base Difco 210430, Merck 1.05285, Oxoid CM 671, Acumedia 7241.

Nota b.3) Para alimentos desidratados a AOAC validou o procedimento de refrigeração dos caldos de pré enriquecimento e enriquecimento seletivo (TT e SC) durante o final de semana. As amostras enriquecidas podem ser mantidas a 4±1°C por até 72 horas (AOAC Official Method 994.04). O Caldo RV não faz parte do escopo dessa validação.

Nota b.4) Se for utilizada a composição úmida, o volume de caldo RV, TT ou SC deve ser multiplicado pelo número de amostras compostas, para receber o inóculo de cada pré enriquecimento individual, na mesma proporção.

c) Plaqueamento diferencial

Agitar os tubos de enriquecimento seletivo em agitador tipo "vortex" e estriar (estrias de esgotamento) uma alçada do caldo TT em placas de Ágar Entérico de Hectoen (HE), Ágar Bismuto Sulfito (BS) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). Repetir esse procedimento com o caldo RV (ou SC no caso de goma guar e alimentos suspeitos de contaminação com *Salmonella* Typhi). Incubar as placas invertidas a 35±2°C/24±2h e verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*. No caso do BS, fazer uma leitura com 24 horas, reincubar e repetir a leitura com 48 horas. Características típicas das colônias de *Salmonella* nos meios de plaqueamento:

Ágar HE. Colônias transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro preto. Cepas fortemente produtoras de H_2S podem produzir colônias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas. Colônias de fermentadores de lactose ou sacarose são de cor salmão e não transparentes. Algumas poucas cepas de *Salmonella* podem apresentar colônias atípicas, amarelas, com ou sem centro preto. Na ausência de colônias típicas essas colônias devem ser selecionadas em seu lugar.

Ágar XLD. Colônias cor de rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente em redor. Cepas de *Salmonella* H_2S fortemente positivas podem produzir colônias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas. Cepas de *Salmonella* H_2S negativas produzem colônias cor de rosa com centro rosa mais escuro, mas não preto. Cepas de *Salmonella* lactose positivas produzem colônias amarelas com ou sem centro preto. Na ausência de colônias típicas essas colônias devem ser selecionadas em seu lugar.

Ágar BS. Colônias castanhas, cinza ou pretas, com ou sem brilho metálico. O meio em redor das colônias muda gradativamente para uma coloração castanha a preta, com o prolongamento do tempo de incubação. Algumas cepas de *Salmonella* podem apresentar colônias atípicas, verdes, com pouco ou nenhum escurecimento do meio em redor. Na ausência de colônias típicas após 48h de incubação, essas colônias devem ser selecionadas em seu lugar. Observação: Os fabricantes recomendam que as placas de BS sejam preparadas no dia do uso, porém, diversos estudos têm demonstrado que o meio recém-preparado é tóxico para várias cepas de *Salmonella*. A FDA recomenda preparar um dia antes do uso e estocar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

d) Confirmação preliminar das colônias típicas de *Salmonella*

Selecionar pelo menos duas colônias típicas de cada placa, para confirmação preliminar. Na ausência de colônias típicas, selecionar as atípicas descritas acima. Com o auxílio de uma agulha de inoculação, tocar levemente a massa de células, no centro da colônia e inocular em um tubo inclinado de Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), por estrias na rampa e picada no fundo. Com o mesmo inóculo, sem flambar a agulha, inocular a cultura em um tubo de Ágar Lisina Ferro

(LIA), com duas picadas no fundo e estrias na rampa. Guardar as placas sob refrigeração (5 a 8°C) e incubar os tubos a 35±2°C/24±2h.

> **Nota d.1)** Os tubos de LIA devem ser inclinados com fundo de no mínimo 4cm, para garantir condições anaeróbias (a reação de descarboxilação da lisina ocorre anaerobicamente). Na incubação as tampas de ambos os tubos, LIA e TSI, devem ser afrouxadas, para manter condições aeróbicas na rampa (prevenir a excessiva produção de H_2S).

Após o período de incubação, observar se há ocorrência de reação típica de *Salmonella*: Em TSI rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H_2S (escurecimento do ágar). Em LIA fundo e rampa alcalinos (roxo, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H_2S (escurecimento do meio).

Se nenhuma cultura de uma dada placa apresentar reação típica em TSI, inocular duas novas colônias dessa placa em TSI, para confirmação. Se alguma cultura apresentar evidência de contaminação (cultura mista), estriar em placas de HE, XLD ou Ágar MacConkey, para purificação. Incubar as placas a 35±2°C/24±2h e observar se há colônias típicas: HE e XLD, já descritas, Ágar MacConkey colônias transparentes, sem cor, eventualmente com centro preto e, na presença de contaminantes que precipitam a bile, provocam o clareamento da zona de precipitação em seu redor. Selecionar duas colônias típicas bem isoladas e inocular novamente em LIA e TSI.

Submeter as culturas à confirmação definitiva obedecendo os seguintes critérios:

Reação em LIA	Reação em TSI	Continuação
Rampa e fundo alcalinos com ou sem H_2S (típica)	Rampa alcalina fundo ácido com ou sem H_2S (típica)	continuar
Rampa e fundo alcalinos com ou sem H_2S (típica)	Rampa e fundo ácidos com ou sem H_2S (atípica)	continuar
Fundo ácido e rampa alcalina com ou sem H_2S (atípica)	Rampa alcalina fundo ácido com ou sem H_2S (típica)	continuar
Fundo ácido e rampa alcalina com ou sem H_2S (atípica)	Rampa e fundo ácidos (atípica)	descartar

e) Confirmação definitiva

Utilizar as culturas em TSI na realização das provas sorológicas e bioquímicas de confirmação. Para os testes bioquímicos, utilizar um dos seguintes "kits" de identificação validados pela AOAC para *Enterobacteriaceae*: API 20E (BioMeriéux Vitek), Vitek GNI (BioMeriéux Vitek), Enterotube II (Beckton Dicson), *Enterobacteriaceae* II (Beckton Dicson) e Micro ID (Remel). Alternativamente, aplicar a série bioquímica descrita abaixo. Os testes sorológicos não devem ser substituídos por "kits" comerciais.

e.1) Teste de urease. Transferir uma alçada da cultura em TSI para um tubo com Caldo Uréia de Rustigian & Stuart e incubar a 35+2°C/24+2h. Incubar paralelamente um tubo controle não inoculado, porque o Caldo Uréia ocasionalmente apresenta uma falsa reação positiva. Observar viragem alcalina do indicador, com alteração da cor do meio de pêssego para cor de rosa escuro (teste positivo), ou permanência do meio na cor original (teste negativo). Opcionalmente pode ser utilizado o teste rápido: transferir duas alçadas (inóculo pesado) da cultura em TSI para um tubo de caldo Uréia Rápido. Incubar em banho a 37±0,5°C/2h e observar como no teste convencional. Todas as cepas de *Salmonella* são negativas nesse teste.

e.2) Teste de descarboxilação da lisina no Caldo Descarboxilase de Falkow. Este teste é requerido apenas para as culturas cuja reação em LIA não tenha sido satisfatória (atípicas com fundo amarelo e rampa alcalina, com ou sem produção de H_2S), porém não descartada em função da reação típica em TSI. A partir da cultura em TSI, transferir uma alçada com inóculo leve para um tubo de Caldo Descarboxilase de Falkow (com 0,5% de L-Lisina). Incubar a 35±2ºC/48±2h com a tampa bem fechada e observar, com 24 e 48h, se ocorre viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio de esverdeado para púrpura azulado (teste positivo) ou viragem ácida para amarelo (teste negativo).

e.3) Teste de fermentação do dulcitol. Transferir uma alçada com inóculo leve da cultura em TSI, para um tubo de Caldo Vermelho de Fenol Base ou Caldo Púrpura Base suplementado com 0,5% de dulcitol (com tubo de Durhan). Incubar a 35±2ºC/48±2h com a tampa ligeiramente afrouxada e observar, com 24 e 48h. Ocorrência de viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio para amarela, com ou sem formação de gás indica teste positivo. Viragem alcalina (para rosa escuro no Caldo Vermelho de Fenol ou para púrpura no Caldo Púrpura) ou não alteração da cor do meio, acompanhada da ausência de gás indica teste negativo.

e.4) Teste de indol. Transferir uma alçada com inóculo leve da cultura em TSI, para tubos com Caldo Triptona 1% e incubar a 35+2ºC/24+2h. Após a incubação, transferir uma alíquota de 5ml da cultura para um tubos estéril vazio (para o teste de indol) e reservar o restante para inoculação dos testes de malonato e crescimento em KCN. Para o teste de indol, adicionar 0,2 a 0,3ml do Reagente de Kovacs aos 5ml de cultura em Caldo Triptona e agitar levemente. Observar se há desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo), ou se o anel permanece amarelado, cor do reagente de Kovacs (teste negativo). Desenvolvimento de vários tons entre vermelho e rosa indica teste indeterminado.

e.5) Teste de crescimento em KCN. O teste é feito em Caldo Cianeto de Potássio, que deve ser preparado em tubos com tampa de rolha recobertas de parafina (vide Anexo 1 de Preparo de Meios e Reagentes Para Análises). **Cuidado!!** O meio é tóxico e deve ser preparado e manuseado com luvas. A partir da cultura reservada em Caldo Triptona 1%, inocular três alçadas (inóculo pesado) em um tubo de Caldo Cianeto de Potássio. Flambar a boca do tubo, aquecendo para formar um selo de parafina ao tampar com a rolha. Incubar a 35±2ºC/48±2h e observar, com 24 e 48 horas, se ocorre crescimento (turvação do meio), indicativo de teste positivo. Não turvação do meio indica não crescimento, teste negativo.

e.6) Teste de malonato. A partir da cultura reservada em Caldo Triptona 1%, inocular três alçadas (inóculo pesado) em um tubo de Caldo Malonato Modificado. Incubar a 35±2ºC/48±2h, incluindo um tubo não inoculado como controle, porque o Caldo Malonato eventualmente pode sofrer viragem para azul (falso positivo). Observar com 24 e 48h a ocorrência de viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio de verde para azul (teste positivo). A permanência da cor verde do meio inalterada indica teste negativo. Eventualmente pode ocorrer viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio para amarelo, devido à fermentação da glucose presente (teste negativo).

e.7) Detecção dos antígenos flagelares (poli H). Transferir uma alçada da cultura em TSI, para um tubo com 5ml de Caldo Tripticase de Soja (TSB) e incubar a 35±2°C/24±2h. Opcionalmente, para realização do teste no mesmo dia, usar o Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubar a 35±2°C/4-6h ou até crescimento visível. Adicionar aos 5ml de cultura em TSB ou BHI, 2,5ml de Solução Salina Formalinizada (Formalina), para a obtenção do antígeno flagelar a ser detectado no teste. Transferir para um tubo de 10x75mm ou 13x100mm, 0,5ml da cultura formalinizada (antígeno) e 0,5ml de anti-soro flagelar polivalente contra *Salmonella* (anticorpos). Preparar um tubo controle negativo, com 0,5ml do antígeno (cultura formalinizada) e 0,5ml de formalina. Incubar os tubos a 48-50°C/1h, em banho, e observar os resultados de 15 em 15 minutos, manuseando delicadamente os tubos, para evitar agitação. A ocorrência de aglutinação/floculação no tubo-teste, porém não controle negativo, indica teste positivo. A ausência de aglutinação/floculação nos dois tubos indica teste negativo. A ocorrência de floculação nos dois tubos indica reação não específica. Nesse caso, repetir o procedimento usando o antisoro Spicer-Edwards.

Nota e.1) Nessa etapa do procedimento, todas as culturas que apresentarem os seguintes conjuntos de resultados podem ser descartadas como não *Salmonella*: teste de indol positivo e teste sorológico flagelar polivalente negativo ou teste de lisina descarboxilase negativo e crescimento em KCN positivo.

e.8) Detecção dos antígenos somáticos (poli O). A partir da cultura de 24 horas em TSI, emulsionar uma alçada em 2ml de solução salina 0,85% estéril. Marcar dois quadrados de aproximadamente $2cm^2$ em uma placa de Petri ou lâmina de vidro, usando um lápis de marcar vidro de material hidrofóbico. Transferir uma gota da cultura em salina para cada um dos quadrados demarcados, posicionando a cultura na parte superior do quadrado. Adicionar uma gota de solução salina fisiológica estéril na posição inferior de um dos quadrados e emulsionar bem a cultura. Sobre a parte inferior do outro quadrado, adicionar uma gota do anti-soro somático polivalente anti-*Salmonella* e emulsionar bem. Segurando a lâmina contra um fundo preto bem iluminado, fazer delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina, para movimentar a emulsão, observando se ocorre aglutinação no quadrado com o anti-soro. Comparar com a aparência da emulsão no quadrado com salina (controle negativo), para não confundir a aparência turva da emulsão com reação de aglutinação. Eventualmente pode ocorrer aglutinação em ambos os quadrados (reação inespecífica). **Atenção**. Antes da realização dos testes, verificar a qualidade do anti-soro em cada frasco utilizado. Para tanto, aplicar o teste sorológico somático a uma cepa padrão de *Salmonella*.

Nota e.2) Nessa etapa do procedimento podem ser consideradas como *Salmonella* as culturas que apresentarem o seguinte perfil: fermentação da glicose em TSI positiva (fundo ácido), lisina descarboxilase positiva (fundo e rampa alcalinos em LIA ou fundo ácido mas lisina positiva no teste em Caldo Descarboxilase de Falkow), produção de H_2S positiva em TSI e LIA, teste de urease negativo, fermentação do dulcitol positiva, crescimento em KCN negativo, teste de malonato negativo, teste de indol negativo, teste sorológico flagelar polivalente positivo e teste sorológico somático polivalente positivo. Culturas com uma ou mais reações atípicas devem ser submetidas aos testes adicionais descritos nos itens abaixo (e.9 a e.11).

e.9) Teste de fermentação da lactose e sacarose. Seguir o mesmo procedimento descrito para o teste de fermentação do dulcitol, substituindo o dulcitol por 1% de lactose ou sacarose.

Descartar como não *Salmonella* as culturas lactose positivas, exceto as malonato positivas (podem ser da subsp. *arizonae*) ou as que apresentaram rampa ácida em TSI com reação típica em LIA. Descartar como não *Salmonella* as culturas sacarose positivas, exceto as que apresentaram rampa ácida em TSI com reação típica em LIA.

e.10) Teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer. Transferir uma alçada com inóculo leve da cultura em TSI, para um tubo com caldo VM-VP e incubar a 35ºC/48h. Para o teste de VP, transferir assepticamente 1ml da cultura para um tubo de ensaio, adicionar 0,6ml de uma solução de α-naftol 5% e agitar. Adicionar em seguida 0,2ml de uma solução de KOH 40%, agitar e adicionar uma pitada leve de cristais de creatina, para acelerar a reação. Deixar descansar à temperatura ambiente e fazer a leitura após quatro horas. O desenvolvimento de uma cor rosa escuro ou vermelho rubi no meio de cultura indica teste positivo. A permanência do meio na cor do reagente (amarelada ou ligeiramente esverdeada) indica teste negativo. Reincubar a cultura remanescente no caldo VM/VP por 48 horas adicionais e realizar o teste de VM com 96 horas de incubação. Para a realização do teste, adicionar a cada 5ml de cultura, cinco a seis gotas da solução de vermelho de metila e observar imediatamente se o meio adquire uma coloração vermelha (teste positivo) ou amarela (teste negativo).

e.11) Teste de citrato. Com uma agulha de inoculação, transferir um inóculo leve da cultura para um tubo de Ágar Citrato de Simmons inclinado, estriando a rampa e picando o fundo. Incubar a 35ºC/96h e observar se há crescimento com viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio de verde para azul (teste positivo). A não ocorrência de crescimento, mantendo a cor do meio inalterada, indica teste negativo.

f) Interpretação dos resultados

f.1) Se foi utilizado um "kit" miniaturizado de identificação, validado pela AOAC

f.1.a.) Considerar como *Salmonella* as culturas identificadas como tal pelo "kit" e que apresentarem testes sorológico flagelar e somático polivalentes positivos.

f.1.b) Descartar as culturas não identificadas como *Salmonella* pelo "kit".

f.1.c) Culturas que não se enquadrarem nos itens f.1.a ou f.1.b devem ser enviadas a um laboratório apto à realização dos testes necessários para a confirmação definitiva.

f.2) Se foram feitos os testes bioquímicos descritos no item e:

f.2.a) Considerar como *Salmonella* as culturas com o perfil abaixo:

- Fermentação da glicose em TSI (+) (fundo ácido)
- Lisina descarboxilase (em LIA ou no Caldo Descarboxilase de Falkow) (+)
- Produção de H_2S em TSI e em LIA (+)
- Teste de urease (-)
- Fermentação do dulcitol (+)
- Crescimento em KCN (-)
- Teste de malonato (-)
- Teste de indol (-)
- Teste sorológico flagelar polivalente (+)
- Teste sorológico somático polivalente (+)
- Fermentação da lactose (-)

- Fermentação da sacarose (-)
- Teste de VP (-)
- Teste de VM (+)

f.2.b) Descartar como não *Salmonella* as culturas com qualquer um dos conjuntos de resultados apresentados abaixo:

- Teste de urease (+)
- Teste de indol (+) e teste flagelar polivalente (-)
- Teste de indol (+) e teste Spicer Edwards flagelar (-)
- Lisina descarboxilase (-) e crescimento em KCN (+)
- Fermentação da lactose (+) exceto as malonato positivas (podem ser da subsp. *arizonae*) ou as que apresentaram rampa ácida em TSI com reação típica em LIA
- Fermentação da sacarose (+) exceto as que apresentaram rampa ácida em TSI com reação típica em LIA
- VM (-), VP (+) e crescimento em KCN (+)

19.4. MÉTODO MLG/FSIS (2008)

Método do Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture (USDA), revisão de fevereiro de 2008 do Capítulo 4.04 do *Microbiology Laboratory Guidebook* (MLG/FSIS, 2008), disponível no site do USDA <http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp>, acessado em 30/10/09.

Em princípio o método do FSIS-USDA é aplicável a produtos derivados de carne, aves e ovos, porém, a revisão de fevereiro de 2008 também inclui molhos desidratados, leite em pó, alimentos prontos para consumo e misturas em pó para o preparo de pão. Variações no procedimento em função do tipo de produto são apresentadas em notas ao longo do texto, que devem ser consultadas para cada amostra analisada.

19.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Água Peptonada Tamponada (BPW)
- Água Peptonada Tamponada com cristal violeta (1ml da solução aquosa 1% por litro) (para a análise de produtos fermentados)
- Carbonato de cálcio ($CaCO_3$) estéril para a análise de produtos fermentados
- Caldo Rappaport-Vassilidis Modificado (RV) ou Caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS)
- Caldo Tetrationato Hajna (TTH)
- Ágar Verde Brilhante Sulfa (BGS)
- Ágar Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4) ou Ágar Lisina Ferro Duplamente Modificado (DM-LIA)
- Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI)
- Ágar Lisina Ferro (LIA)
- Solução Salina Formalinizada (Formalina)
- Anti-soro flagelar polivalente anti-*Salmonella*
- Anti-soro Spicer-Edwards flagelar
- Anti-soro somático polivalente anti-*Salmonella*
- “Kits” de identificação ou meios e reagentes para provas bioquímicas (os mesmos do método da FDA, se não for usado um “kit”)
- Estufa incubadora a 35±2°C com termômetro calibrado

- Banho ou estufa incubadora a 42±0,5ºC com termômetro calibrado
- Banho a 48-50ºC

19.4.2. PROCEDIMENTO

O esquema da análise de *Salmonella* pelo método MLG/FSIS (2008) encontra-se descrito na Figura 19.3. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na detecção da presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Pré-enriquecimento

a.1) Teste de presença/ausência. Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar uma porção de 25±0,5g da amostra em 225ml de Água Peptonada Tamponada (BPW). Se for utilizada composição de amostras a seco, manter a proporção 1:10 na diluição em BPW. Incubar a 35±2ºC/20-24h.

Nota a.1) Para a análise de carcaças de aves inteiras, drenar o excesso de líquido das embalagens e transferir a carcaça para uma bolsa plástica estéril. Adicionar 400ml de BPW na cavidade da carcaça e, segurando a carcaça com uma mão e fechando a abertura da bolsa com a outra, agitar rodando o líquido na bolsa (cerca de 35 RPM), de forma a lavar a parte interna e externa da carcaça. Transferir 30ml do líquido de lavagem para uma bolsa ou frasco com 30ml de BPW, para continuar a análise. Se, além de *Salmonella*, outras análises forem requeridas para essas amostras, efetuar a lavagem das carcaças com Tampão Fosfato (em lugar do BPW) e transferir 30ml do líquido de lavagem para uma bolsa ou frasco com 30ml de BPW em concentração dupla.

Nota a.2) Para a análise de cortes de carne crua, não moída, pode ser feita a lavagem superficial (como as carcaças de aves), agitando ou massageando vigorosamente as amostras com a quantidade de BPW necessária para diluição 1:10. Alternativamente podem ser cortados pequenos pedaços com uma tesoura estéril e homogeneizados em liqüidificador ou "stomacher".

Nota a.3) Para a análise de carcaças coletadas com esponja, transferir a esponja para uma bolsa estéril e adicionar 50ml de BPW.

Nota a.4) Para a análise de ovo em pó, leite em pó, molhos desidratados e misturas em pó para o preparo de pão, adicionar um pequeno volume inicial de BPW, homogeneizar até obter uma suspensão homogênea e adicionar então o volume remanescente do caldo.

Nota a.5) Para a análise de produtos fermentados, suplementar a Água Peptonada Tamponada com cristal violeta (1ml da solução aquosa 1% estéril por litro de BPW). Adicionar inicialmente, a cada 25g de amostra, 100ml de BPW com cristal violeta e 0,77g de carbonato de cálcio (pó estéril), homogeneizando em "stomacher" ou liquidificador por cerca de dois minutos. Adicionar então o restante dos 225ml de BPW com cristal violeta. Se a amostra for composta, multiplicar a quantidade de carbonato de cálcio pelo número de unidades de amostra compostas.

a.2) Contagem pela técnica do NMP. Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar 25+0,5g da amostra em 225ml de Água Peptonada Tamponada (BPW). Preparar diluições decimais seriadas usando Água Peptonada 0,1% (H_2Op) ou Tampão Fosfato (PB) nos tubos de diluição. Transferir três alíquotas de 10ml da diluição 10^{-1} para três tubos estéreis vazios, três alíquotas de 1ml da 10^{-1} para três tubos com 9ml de BPW e três alíquotas de 1ml da 10^{-2} para três tubos com 9ml de BPW. Incubar todos os tubos e o restante da diluição 10^{-1} a 35+2ºC/20-24h. Realizar todas as etapas subseqüentes do ensaio para cada tubo separadamente, bem como para o restante da diluição 10^{-1}.

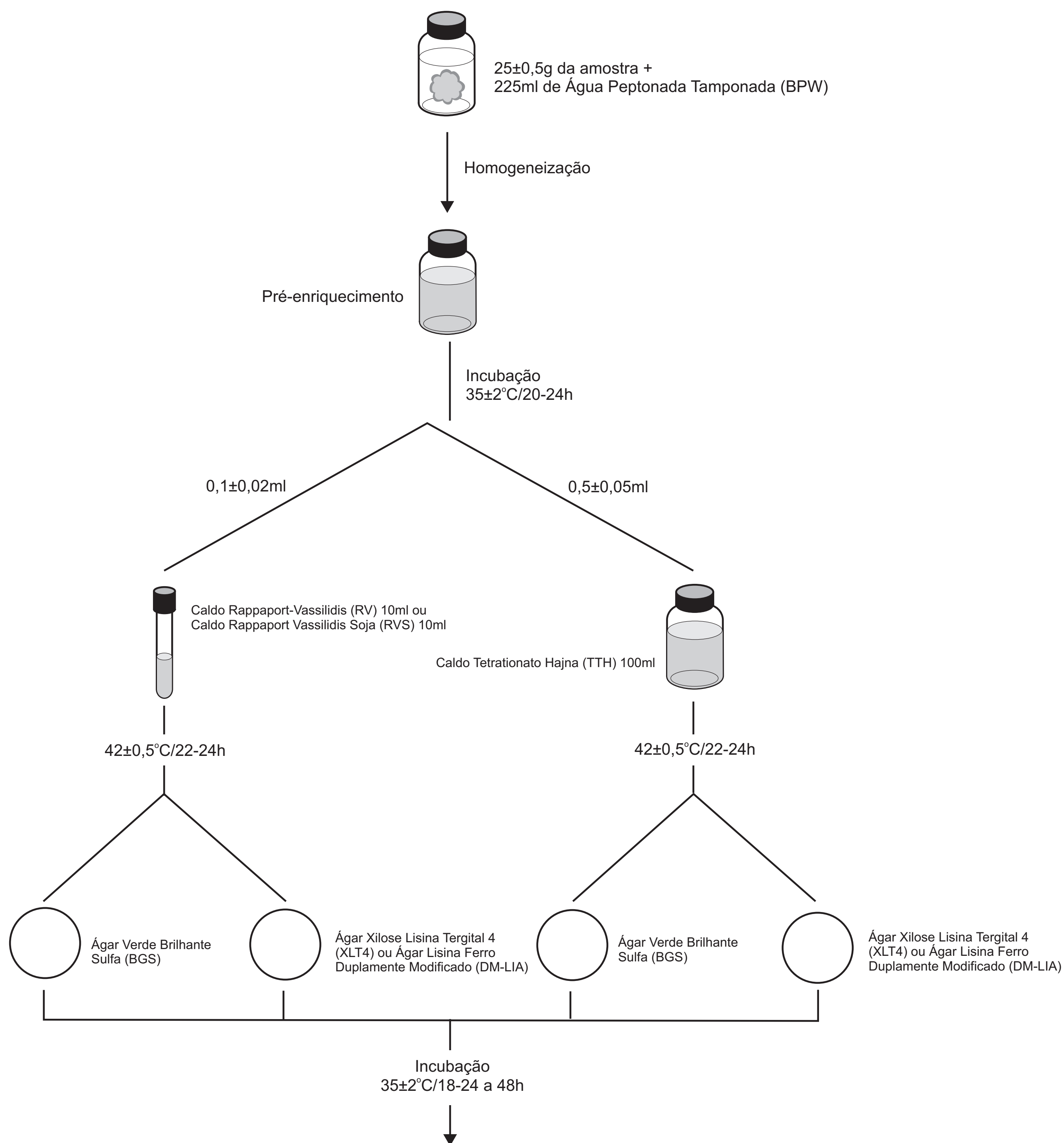


Figura 19.3. Esquema da análise de *Salmonella* pelo método MLG/FSIS (2008).

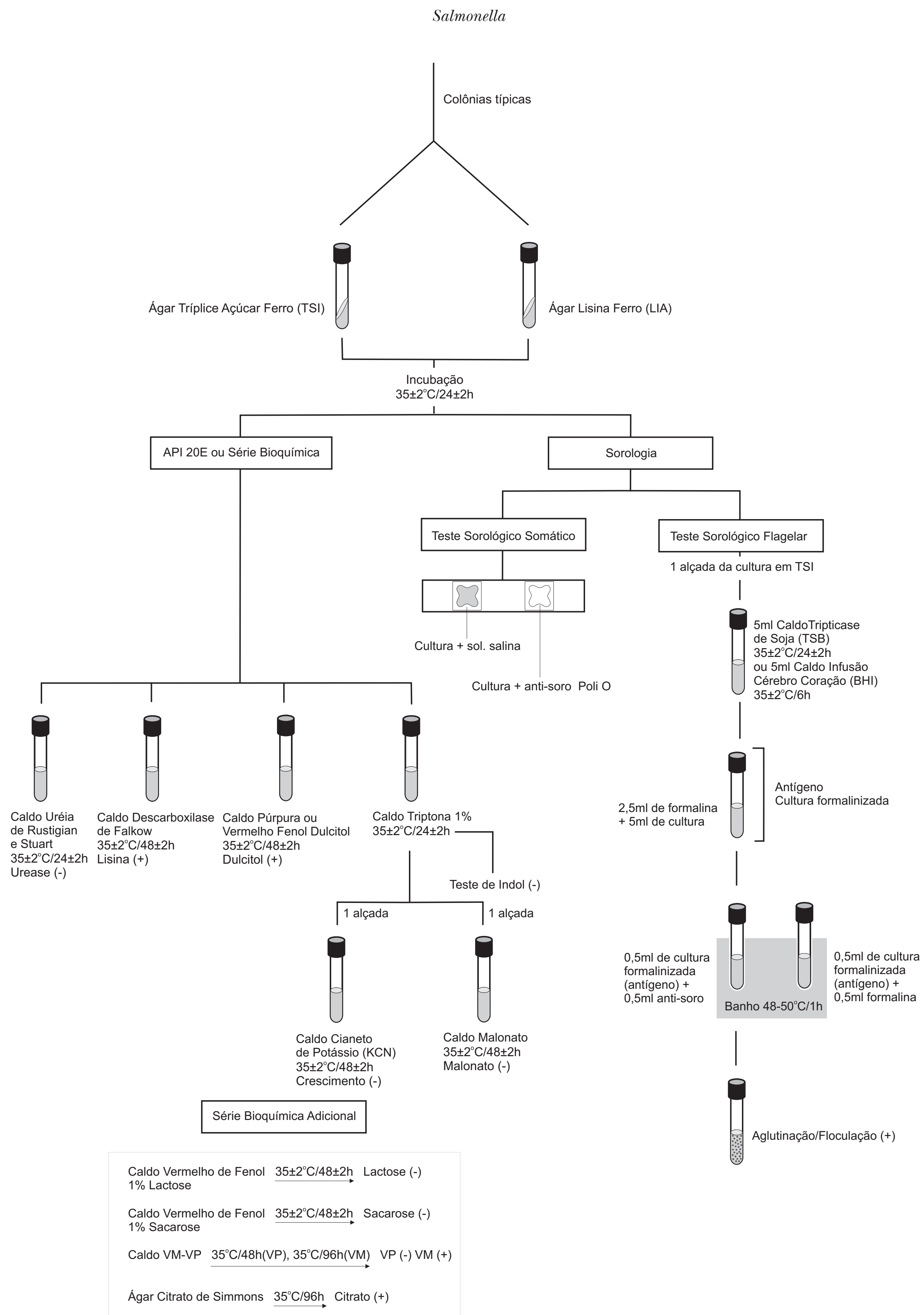


Figura 19.3. continuação.

Nota. As alíquotas indicadas acima (1 – 0,1 e 0,01g) são as mais adequadas para amostras com contagem esperada abaixo de 10/g. No caso de amostras com contagem esperada acima desse nível, inocular diluições mais altas, seguindo as orientações do Capítulo 4.

b) Enriquecimento seletivo

Transferir 0,1±0,02ml da amostra enriquecida para 10ml de Caldo Rappaport-Vassilidis Modificado (RV) ou Caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS) e 0,5±0,05ml para 100ml de Caldo Tetrationato Hajna (TTH). Incubar os caldos de enriquecimento seletivo a 42±0,5°C/22-24h.

Nota b.1) Se for utilizada a composição úmida, multiplicar o volume BPW pelo número de unidades de amostra compostas, na transferência para os caldos RV e TTH. O volume de RV e TTH também deve ser multiplicado pelo número de unidades de amostra compostas, para manter a proporção.

c) Plaqueamento diferencial

Estriar uma alçada do caldo TTH em placas de Ágar Verde Brilhante Sulfa (BGS) e um segundo meio, que pode ser o Ágar Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4) ou o Ágar Lisina Ferro Duplamente Modificado (DM-LIA). Repetir esse procedimento com o caldo RV ou RVS. Incubar as placas invertidas a 35±2°C/18-24h e verificar se há desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella*. Em caso negativo, reincubar as placas e repetir a leitura com 48 horas. Características típicas das colônias de *Salmonella* nos meios de plaqueamento:

- **Ágar BGS.** Colônias opacas, róseas, lisas, com bordas perfeitas e rodeadas por um halo vermelho. Em placas muito cheias, as colônias têm uma aparência acastanhada contra um fundo verde.

- **Ágar XLT4.** Colônias vermelhas com ou sem centro preto ou colônias inteiramente pretas. Com 24 horas as bordas podem apresentar-se amarelas mas, com o prolongamento da incubação, passam para vermelho.

- **Ágar DM-LIA.** Colônias roxas com ou sem centro preto. A cor do meio permanece inalterada (descarboxilação da lisina, sem fermentação da lactose ou sacarose).

d) Confirmação preliminar das colônias típicas de *Salmonella*

Selecionar pelo menos três colônias típicas de cada placa, para confirmação preliminar. Submeter aos testes de crescimento em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA), da mesma forma descrita no método da FDA. Retirar o inóculo da superfície do centro da colônia, sem tocar o meio de cultura em redor, pois os meios são altamente seletivos e podem inibir o crescimento de várias cepas viáveis.

Submeter ao teste de detecção dos antígenos somáticos (poli O) e flagelares (poli H), da mesma forma descrita no método da FDA. Para a detecção dos antígenos flagelares pode também ser utilizado o Oxoid *Salmonella* Latex Test, seguindo a instrução do fabricante. Se o teste em latex for negativo e a cultura apresentar características indicativas de *Salmonella*, repetir o teste da forma convencional.

Submeter as culturas à confirmação definitiva obedecendo os seguintes critérios:

Reação em TSI	Reação em LIA	Poli O	Poli H	Continuação
Rampa alcalina fundo ácido com H_2S	Rampa e fundo alcalinos com H_2S	+	+	continuar
Rampa alcalina fundo ácido com H_2S	Rampa e fundo alcalinos com H_2S	+	-	continuar
Rampa alcalina fundo ácido sem H_2S	Rampa e fundo alcalinos sem H_2S			continuar
Rampa alcalina fundo ácido sem H_2S	Rampa alcalina e fundo ácido sem H_2S	+	+	continuar*
Rampa alcalina fundo ácido sem H_2S	Rampa alcalina e fundo ácido sem H_2S	-	-	descartar
Rampa alcalina fundo ácido com H_2S	Rampa alcalina e fundo ácido com ou sem H_2S			continuar
Rampa e fundo ácidos sem H_2S	Rampa alcalina e fundo alcalino ou ácido sem H_2S			descartar
Rampa e fundo ácidos com H_2S	Rampa e fundo alcalinos com H_2S			continuar**
Sem alteração de cor no meio				descartar

* *Salmonella* Typhisuis eventualmente encontrada em suínos nos Estados Unidos.
** *Salmonella enterica* subsp *arizonae* ou *diarizonae*.

e) Confirmação definitiva

O MLG/FSIS não descreve as provas bioquímicas de confirmação. Recomenda o uso de um "kit" de identificação ou as provas descritas pelo método AOAC 967.27, que são as mesmas usadas no método da FDA.

19.5. REFERÊNCIAS

ANDREWS, W.H., 1997. New trends in food microbiology: an AOAC International perspective. **Journal of AOAC International 80(4)**:908-912.

ANDREWS, W.H. & HAMMACK, T.S., 2007. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration, **Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 5, updated December 2007. Disponível no site <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>, acesso em 28/08/09.

AOAC, 2009. Rapid Methods Adopted as AOAC Official Methods. Disponível no site <http://www.aoac.org/vmeth/oma_testkits.pdf>, acesso em 28/08/09.

BRENNER, F.W., VILLAR, R.G., ANGULO, F.J. *et al.* (2000). *Salmonella* nomenclature. **J. Clinical Microbiology 38(7)**:2465-2467.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). **Salmonellosis.** National Center for Infectious Diseases/Division of Bacterial and Mycotic Diseases, October 13, 2005. Disponível no site <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm#Top> acesso em 21/02/06.

EDUARDO, M.B.P., KATSUYA, E.M., BASSIT, N.P. & MELLO, M.L.R., 2003. *Salmonella Enteritidis* - uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação sanitária para os alimentos implicados, São Paulo, Brasil, 1999-2003**. Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA), Agosto 2004 Ano 1 Número 8**. Disponível no site <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa8_salmo9903.htm>, acesso em 21/02/06.

ELLERMEIER, C.D. & SLAUCH, J.M. The Genus *Salmonella*. In: DWORKIN *et al.* (Eds.), **The Prokaryotes**: An evolving electronic resource for the microbiological community, 3rd Edition, Release 3.20, 12/31/2005, Springer-Verlag, New York, http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm.

FDA/CFSAN. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook "Bad Bug Book"**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, December 2, 2005. http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. **Microrganisms in Foods 5 – Microbiological Specifications of Food Pathogens.** Blackie Academic & Professional, ISBN 0 412 47350 X.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs **– Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed**. 2002. The International Organization for Standardization, amendment 1: 15/07/2007.

MLG/FSIS, 2008. Isolation and identification of *salmonella* from meat, poultry, and egg products. Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture, **Microbiology Laboratory Guidebook Online**. Chapter 4.04, disponível no site http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp, acesso em 30/10/09.

POPOFF, M.Y. & Le MINOR, L.E., 2005. Genus XXXIII *Samonella.* In: BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc.p. 764-799.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2005. Drug-resistant *Salmonella.* **Fact Sheet N°139**, Revised April 2005. Disponível no site: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/, acesso em 24/02/06.

Capítulo 20

Vibrios Patogênicos

20.1. INTRODUÇÃO

Os membros do gênero *Vibrio* são bactérias primariamente aquáticas, encontradas em água doce ou salgada e, freqüentemente, associadas com animais e plantas. Três espécies provocam doenças transmitidas por alimentos (DTAs): *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*.

A cólera, doença provocada pelas cepas de *V. cholerae* dos sorotipos O1 e O139, é classificada pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) no grupo de risco IA, que inclui as doenças "de severo perigo para a população em geral, com ameaça de morte, seqüelas crônicas ou longa duração".

As doenças provocadas por *V. vulnificus* são classificadas no grupo de risco IB, que inclui as doenças "de severo perigo para população restrita, com ameaça de morte, seqüelas crônicas ou longa duração". Os grupos de risco são indivíduos com níveis altos de ferro no sangue ou com distúrbios hepáticos, relacionados com alto consumo de álcool.

A doença provocada por *V. parahaemolyticus* é classificada no grupo de risco III, que inclui as doenças "de perigo moderado, usualmente de curta duração, sem ameaça de morte ou seqüelas, com sintomas auto limitados mas que causam severo desconforto".

Outras espécies de vibrios também têm sido isoladas de espécimens clínicos, indicando que são patogênicas para humanos. De ocorrência em espécimens intestinais incluem-se *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae* e *V. mimicus*. De ocorrência em espécimens extra intestinais incluem-se *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. harveyi* e *V. metschnikovii* (Brenner *et al.*, 2005).

Taxonomia

As informações abaixo são da 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Brenner *et al.*, 2005).

Vibrio é um gênero da família *Vibrionaceae*, definida como bactérias Gram negativas na forma de bastonetes retos ou curvos, móveis com flagelos peritríqueos e não esporogênicas. São anaeróbias facultativas, apresentando metabolismo respiratório e fermentativo. A maioria das espécies é oxidase positiva, reduz nitrato a nitrito e utiliza a glicose como única fonte de carbono e energia. A maioria não cresce na ausência de NaCl, exigindo íons Na^+ para crescimento. *V. cholerae* cresce na ausência de NaCl mas a concentração ótima de NaCl para a maioria dos outros encontra-se na faixa de 0,5 a 3%. *V. vulnificus*, que pode ser confundido com *V. parahaemolyticus* no isolamento, apresenta requerimento mínimo de NaCl por volta de 0,5%, menor do que o de *V. parahaemolyticus*, que é de 2 a 3%.

Na 1ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg & Holt, 1984) a família *Vibrionaceae* incluía os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*. Na 2º Edição (Brenner *et al.*, 2005) foram feitas várias mudanças na classificação e a família passou a incluir os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Allomonas* e *Listonella*.

O gênero *Aeromonas* foi transferido para a família *Aeromonadaceae* e o gênero *Plesiomonas* para a família *Enterobacteriaceae*. Esses microrganismos também são aquáticos e, eventualmente, podem ser isolados junto com os vibrios. Não são bactérias marinhas, mas podem ser encontradas em sistemas marítimos que têm interface com água doce.

Allomonas e *Listonella* são gêneros novos e ainda não foram descritos separadamente nessa 2ª edição do *Bergey's Manual*. As espécies existentes nesse gêneros estavam anteriormente classificadas como vibrios e assim continuam descritas: *Allomonas enterica* como *Vibrio fluvialis*, *Listonella anguillarum* como *Vibrio anguillarum* e *Listonella pelagia* como *Vibrio pelagius*.

As principais características que diferenciam os gêneros da família *Vibrionaceae* entre si e de *Aeromonas* e *Plesiomonas* encontram-se descritas no Quadro 20.1. A resistência a 150µg do agente vibriostático O/129 (fosfato de 2,4-diamino-6,7,-diisopropil-pteridina) é usada para diferenciar *Vibrio* (geralmente sensível), de *Aeromonas* (geralmente resistente). Em menores concentrações é usada para diferenciar algumas espécies de *Vibrio* entre si. O teste do fio, que verifica a lise das células na presença de 0,5% de desoxicolato de sódio, é usado para diferenciar *Vibrio* (geralmente positivo) de *Aeromonas* e *Plesiomonas* (geralmente negativas). A capacidade de crescer na ausência de NaCl mas não em 6,5% diferencia *Aeromonas* e *Plesiomonas* dos vibrios halofílicos.

Quadro 20.1. Características que diferenciam os gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas*[a] (Brenner *et al.*, 2005)

	Vibrios patogênicos	*Photobacterium*	*Salinivibrio*	*Aeromonas*	*Plesiomonas*
Oxidase	(+)	Variável	+	+	+
Oxidação/Fermentação	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F
Resistência ao O/129[b] (10 µg)	Variável	S	NR	R	NR
Resistência ao O/129[b] (150µg)	S[c]	S	NR	R	S
Teste do fio[d]	+	NR	NR	-	-
Crescimento na ausência de NaCl	(-)	-	Variável	+	+
Crescimento em 6,5% (p/v) de NaCl	(+)	NR	+	-	-
Gás a partir de glicose	-	Variável	NR	Variável	-
Ornitina descarboxilase	Variável	-	-	(-)	+
Fermentação do inositol	(-)	-	NR	-	+
Fermentação do manitol	+	-	Variável	(+)	-
Fermentação da sacarose	(+)	-	+	(+)	-
Liquefação da gelatina	+	-	+	+	-
Crescimento em Água Peptonada Alcalina (APA)	+	+	NR	+	+
Crescimento em TCBS[e]	(+)	+	NR	(-)	-

[a] Símbolos: + = positivo para a maioria das espécies do gênero, - = negativo para a maioria das espécies do gênero, (+) = positivo para a maioria das espécies mas algumas poucas podem ser negativas, (-) = negativo para a maioria das espécies mas algumas poucas podem ser positivas, NR = Não relatado, R = Resistente, S = Sensível.

[b] Agente vibriostático fosfato de 2,4-diamino-6,7,-diisopropil-pteridina (discos com 10 ou 150µg)

[c] Os vibrios geralmente são sensíveis mas crescem os relatos de resistência em cepas de *V. cholerae* na Índia e Bangladesh.

[d] Descrito no procedimento para a análise *V. cholerae*.

[e] Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose.

A 2ªedição do *Bergey's Manual* também traz, separadamente, tabelas com as principais características que diferenciam as 12 espécies de vibrios patogênicos para o homem. Para facilitar a diferenciação, essas espécies podem ser divididas em seis grupos, apresentados no Quadro 20.2.

Quadro 20.2. Características chave para a separação dos vibrios patogênicos em grupos[a,b] (Brenner *et al.*, 2005).

Grupo	Espécies	Crescimento em 0% NaCl	Oxidase	Redução nitrato	Fermentação mio-inositol	Arginina dehidrolase	Lisina descarboxilase
1	*V. cholerae*	+					
	V. mimicus	+					
2	*V. metschinkovii*	-	-	-	d		
3	*V. cincinnatiensis*	-	+	+	+		
4	*V. hollisae*	-	+	+	-	-	
5	*V. damsela*	-	+	+	-	+	
	V. fluvialis	-	+	+	-	+	
	V. furnissii	-	+	+	-	+	
6	*V. alginolyticus*	-	+	+	-	-	+
	V. harveyi	-	+	+	-	-	+
	V. parahaemolyticus	-	+	+	-	-	+
	V. vulnificus	-	+	+	-	-	+

[a] Todos os dados são da reação após incubação a 35-37ºC/48h.
[b] Símbolos: + = maioria das cepas positivas (geralmente 90-100%), d = variável entre as cepas (25-75% positivas), - = maioria das cepas negativas (geralmente 90-100%).

O grupo um inclui os vibrios patogênicos capazes de crescer na absoluta ausência de NaCl (*V. cholerae* e *V. mimicus*), o grupo dois inclui os oxidase e nitrato negativos (*V. metschnikovii*), o grupo três inclui os que fermentam inositol (*V. cincinnatiensis*), o grupo quatro inclui os arginina e lisina negativos (*V. hollisae*), o grupo cinco inclui os arginina positivos (*V. damsela*, *V. fluvialis* e *V. furnissii*) e o grupo seis inclui os arginina negativos e lisina positivos (*V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*). As demais características das espécies patogênicas encontram-se descritas no Quadro 20.3.

V. cholerae é a espécie tipo do gênero *Vibrio* e, também, a mais importante epidemiologicamente, embora nem todas as cepas sejam patogênicas. A espécie é dividida em cerca de 180 sorotipos somáticos e as cepas responsáveis pelas epidemias e pandemias de cólera são do sorotipo O1 ou, nos casos mais recentes, do sorotipo O139. As cepas do sorótipo O1 são ainda divididas nos subtipos Inaba, Ogawa e Hikojima, que apresentam fórmulas antigênicas do tipo AB, AC e ABC, respectivamente.

Uma segunda subdivisão das cepas 01 de *V. cholerae*, baseada nas características de resistência a fagos, resistência à polimixina e outros caracteres bioquímicos, distingue dois biótipos de *V. cholerae*: o biotipo clássico e o biotipo El-Tor. As principais características que distinguem esses dois biótipos encontram-se descritas no Quadro 20.4.

Assim como *V. cholerae*, nem todas as cepas de *V. parahaemolyticus* são patogênicas. As patogênicas distinguem-se das não patogênicas pela produção de uma hemolisina termestável conhecida como "Thermostable Direct Hemolysin" (TDH). A produção da TDH pode ser detectada através da hemólise de eritrócitos humanos no Ágar Wagatsuma, reação conhecida como fenômeno ou reação de Kanagawa. As cepas que provocam gastroenterites em humanos são quase sempre Kanagawa positivas, enquanto as isoladas de água ou produtos do mar são quase sempre negativas.

Epidemiologia

As informações abaixo são do *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos*, do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo (Informe-Net DTA, 2003a,b,c).

V. cholerae. É o agente etiológico da cólera, uma doença intestinal aguda, que geralmente ocorre em surtos explosivos. Caracteriza-se por diarréia aquosa súbita e abundante (com aspecto de água de arroz), sem sangue ou febre, vômitos e cãibras ocasionais, rápida desidratação, acidose

e colapso circulatório. Casos não tratados podem levar à morte em um período de quatro horas a dois dias, com taxa de mortalidade que chega a exceder os 50%. Com tratamento adequado a taxa de mortalidade é menor que 1%. O período de incubação geralmente é de dois a três dias, podendo, em alguns casos, ocorrer na faixa de algumas horas a até cinco dias. Os sintomas são provocados pela ingestão das células do microrganismo, que colonizam o intestino e liberam uma toxina com ação sobre as células epiteliais da mucosa intestinal. A ação da toxina altera o equilíbrio de transporte de íons e provoca a perda de grandes quantidades de água e eletrólitos.

A persistência da doença em zonas endêmicas é facilitada pelos indivíduos infectados, que eliminam *V. cholerae* durante uma a duas semanas de duração da doença. Também contribuem os casos de infecções assintomáticas, muito mais comuns do que os casos graves, bem como o curto período de imunidade pós-infecciosa, que possibilita freqüentes reinfecções. A cólera é uma doença de transmissão hídrica e ocorre primariamente pela ingestão de água ou alimentos de origem aquática contaminados pelas fezes de indivíduos doentes, convalescentes ou portadores assintomáticos (rota fecal-oral). No Brasil, no período de 1991 a 1999, foram notificados 163.476 casos de cólera, com 1.947 óbitos, concentrados principalmente nos anos 1992 a 1994 (149.236 casos e 1.674 óbitos). Como *V. cholerae* não apresenta um absoluto requerimento por NaCl, pode ser encontrado em fontes de água doce e em água salgada. A contaminação por contato pessoa-pessoa é rara, mas a transmissão via água ou alimentos contaminados é comum. Os alimentos mais freqüentemente envolvidos são pescados e frutos do mar, ingeridos crus ou inadequadamente cozidos, bem como vegetais não-cozidos, irrigados com água contaminada.

V. parahaemolyticus. As cepas patogênicas provocam gastroenterites caracterizadas por diarréia líquida, cólica abdominal, náusea, vômitos, dor de cabeça, febre, calafrios e, ocasionalmente, diarréia com sangue ou muco. A doença é causada pela ingestão de alimentos contaminados com cepas patogênicas, que se fixam no intestino delgado e excretam uma toxina ainda não identificada. A dose infectiva geralmente é maior que 10^6 células, mas pode ser menor em indivíduos que fazem uso de antiácidos. A doença geralmente é leve ou moderada, embora alguns casos possam requerer hospitalização. O período de incubação normalmente varia de 12 a 24 horas após a ingestão, podendo, em alguns casos, ocorrer na faixa de quatro a 30 horas. A duração varia de dois a sete dias e infecção sistêmica ou morte são raras. Casos esporádicos e surtos têm sido registrados em várias partes do mundo como Japão, Sul da Ásia e Estados Unidos, ocorrendo principalmente em meses quentes. Não há dados sobre a freqüência do patógeno no Brasil. O reservatório é o ambiente marinho e os alimentos associados são peixes e moluscos (em geral ostras), crus ou mal cozidos. Há uma correlação entre a doença e o consumo dos alimentos nos meses quentes do ano. Refrigeração inadequada ou manutenção dos alimentos contaminados em temperatura favorável à proliferação são as principais causas da doença. A prática de lavar os pescados e frutos do mar com a água do mar são também uma causa de contaminação. Indivíduos de qualquer faixa etária são susceptíveis e o diagnóstico é confirmado pelo isolamento de vibrios Kanagawa positivos das fezes dos pacientes ou dos alimentos suspeitos (10^5 células/g ou maior).

V. vulnificus. Causa infecções em feridas, gastroenterites ou uma síndrome conhecida como "septicemia primária". Infecções mais graves geralmente ocorrem em indivíduos com comprometimento hepático, alcoolismo crônico, hemocromatose e imunodeprimidos. Nesses indivíduos o microrganismo atinge a corrente sangüínea, provoca choque séptico e leva rapidamente à morte (cerca de 50% dos casos). Presume-se que a dose infectiva seja de menos de 100 organismos. Trombocitopenia é comum e muitas vezes há evidências de coagulação intravascular disseminada. Lesões na pele ou lacerações provocadas por corais, peixes, etc., podem

ser contaminadas com o organismo através da água do mar. Mais de 70% das pessoas infectadas podem apresentar lesões de pele tipo bulbar. A ingestão de *V. vulnificus* por indivíduos saudáveis pode provocar gastroenterite, cuja dose infectiva é desconhecida. O período de incubação da gastroenterite é de 12 a 72 horas após a ingestão.

O meio ambiente marinho é o habitat natural de *Vibrio vulnificus* e casos esporádicos podem ocorrer nos meses quentes do ano, mas não há dados sobre a freqüência do patógeno no Brasil. O modo de transmissão é a ingestão de alimentos contaminados ou a contaminação de feridas. Os alimentos freqüentemente associados são ostras, mexilhões e caranguejos consumidos crus ou mal cozidos.

Quadro 20.3. Principais características das espécies patogênicas de *Vibrio* (Brenner *et al.*, 2005).

Teste[a]	*V. cholerae*	*V. alginolyticus*	*V. cincinnatiensis*	*V. damsela*	*V. fluvialis*	*V. furnissii*	*V. harveyi*	*V. hollisae*	*V. metchnikovii*	*V. mimicus*	*V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus*
TCBS Agar[b]	Bom Amarelas	Bom Amarelas	Muito pobre Amarelas	Pobre Verdes (95)	Bom Amarelas	Bom Amarelas	Bom Amarelas	Muito pobre Verdes	Pode ser pobre Amarelas	Bom Verdes	Bom Verdes (99)	Bom Verdes (90)
mCPC Agar[cg]	Roxas	Não cresce	NR	NR	Não cresce	Não cresce	NR	Não cresce	Não cresce	Não cresce	Não cresce	Amarelas
CC Agar[dg]	Roxas	Não cresce	NR	NR	Não cresce	Não cresce	NR	Não cresce	Não cresce	Não cresce	Não cresce	Amaelas
AIA[ge]	Ka	KA	NR	NR	KK	KK	NR	Ka	KK	KA	KA	KA
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Nitrato (1% NaCl)	+ (99)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Indol (BHI 1% NaCl)[f]	+ (99)	+ (85)	- (92)	-	- (87)	- (89)	+	+ (97)	- (80)	+ (98)	+ (98)	+ (97)
VP (1% NaCl)	+ (75)	+ (95)	-	+ (95)	-	-	+/- (50/50)	-	+ (96)	- (91)	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- (99)	- (85)	- (99)
Arginina (Moellers 1% NaCl)	-	-	-	+ (95)	+ (93)	+	-	-	+ (60)	-	-	-
Lisina(Moellers 1% NaCl)	+ (99)	+ (99)	+ (57)	+/- (50/50)	-	-	+	-	- (65)	+	+	+ (99)
Ornitina (Moellers 1% NaCl)	+ (99)	+/- (50/50)	-	-	-	-	-	-	-	+ (99)	+ (95)	+ (55)
Gelatinase (1% NaCl- 22 ºC)	+ (90)	+ (90)	-	- (94)	+ (85)	+ (86)	-	-	+ (65)	+ (65)	+ (95)	+ (75)
Glicose ácido	+	+	+	+	+	+	+/- (50/50)	+	+	+	+	+
Glicose gás	-	-	-	- (90)	-	+	-	-	-	-	-	-
Acido de												
L-Arabinose	-	- (99)	+	-	+ (93)	+	-	+ (97)	-	- (99)	+ (80)	-
D-Arabitol	-	-	-	-	+ (65)	+ (89)	-	-	-	-	-	-
Celobiose	- (92)	- (97)	+	-	- (70)	- (89)	+/- (50/50)	-	- (91)	-	- (95)	+ (99)
Lactose	- (93)	-	-	-	- (97)	-	-	-	+/- (50/50)	- (79)	- (99)	+ (85)
Maltose	+ (99)	+	+	+	+	+	+	-	+	+ (99)	+ (99)	+
D-manitol	+ (99)	+	+	-	+ (97)	+	+/- (50/50)	-	+ (96)	+ (99)	+	- (55)
D-manose	+ (78)	+ (99)	+	+	+	+	+/- (50/50)	+	+	+ (99)	+	+ (98)
Sacarose	+	+ (99)	+	- (95)	+	+	+/- (50/50)	-	+	-	- (99)	- (85)
Salicina	- (99)	- (96)	+	-	-	-	-	-	- (91)	-	- (99)	+ (95)
Lipase	+ (92)	+ (85)	- (64)	-	+ (90)	+ (89)	-	-	+	- (83)	+ (90)	+ (92)
Teste ONPG	+ (94)	-	+ (86)	-	- (60)	- (65)	-	-	+/- (50/50)	+ (90)	- (95)	+ (75)
Crescimento (pv)												
0% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1% NaCl	+	+ (99)	+	+	+ (99)	+ (99)	+	+ (99)	+	+	+	+ (99)
3% NaCl[g]	+	+	NR	NR	+	+	NR	+	+	+	+	+
6% NaCl	+ (53)	+	+	+ (95)	+ (96)	+	+	+ (83)	+ (78)	- (51)	+ (99)	+ (65)
8% NaCl	- (99)	+ (94)	+ (62)	-	+ (71)	+ (78)	-	-	- (56)	-	+ (80)	-
10% NaCl	-	+ (69)	-	-	- (96)	-	-	-	- (96)	-	- (98)	-
12% NaCl	-	- (83)	-	-	-	-	-	-	-	-	- (99)	-
Crescimentoº42C[g]	+	+	NR	NR	Variável	-	NR	NR	Variável	+	+	+
Sensibilidade O/129 (10µg)[gh]	S	R	NR	NR	R	R	NR	NR	S	S	R	S
Sensibilidade O/129 (150µg)[gh]	S	S	NR	NR	S	S	NR	NR	S	S	S	S

[a] Resultados após incubação a 36ºC/48h (a menos que especificada outra condição): (1% NaCl) = meio padrão com concentração de NaCl ajustada em 1% (p/v), + = 100% das cepas positivas e - = 100% das cepas negativas (a menos que especificada outra porcentagem entre parênteses), NR = Não relatado.

[b] Crescimento e cor das colônias no Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose

[c] Cor das colônias no Ágar Celobiose Polimixina Colistina Modificado.

[d] Cor das colônias no Ágar Celobiose Colistina.

[e] Reação no Ágar Arginina Ferro, KK = rampa e fundo alcalinos, KA = rampa alcalina e fundo ácido, Ka = rampa alcalina e fundo levemente ácido.

[f] Caldo Infusão Cérebro Coração com 1% de NaCl.

[g] Dados do *Bacteriological Analitycal Manual Online* (Kaysner & De Paola, 2004), não especifica a % de cepas que apresentam o resultado relatado.

[h] Agente vibriostático 2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina.

Quadro 20.4. Características que diferenciam as cepas de *V. cholerae* O1 nos biotipos clássico e El-Tor[a] (Brenner *et al.*, 2005).

Característica	Biotipo clássico	Biotipo El-Tor
Freqüência de ocorrência no subcontinente indiano	Ocasional	Comum
Freqüência de ocorrência no resto do mundo	Muito raro	Comum
Hemólise de células vermelhas do sangue	-	+
Teste de VP	-	+
Sensibilidade à polimixina B (discos de 50 unidades)	+	-
Aglutinação de células vermelhas do sangue de galinhas	-	+
Lise pelo bacteriófago Clássico IV	+	-
Lise pelo bacteriófago FK	+	-
Lise pelo bacteriófago El Tor 5	-	+

[a] Símbolos: + = maioria das cepas positivas (geralmente 90-100%), d = variável entre as cepas (25-75% positivas), - = maioria das cepas negativas (geralmente 90-100%).

Métodos de análise

Os métodos culturais da Food and Drug Administration (FDA) (Kaysner & De Paola, 2004) e da American Public Health Association (APHA) (Kaysner & De Paola, 2001), para o isolamento ou contagem de víbrios em alimentos, são baseados, principalmente, na capacidade de crescer em condições alcalinas e na presença de concentrações relativamente altas de sais biliares. Geralmente incluem uma etapa de enriquecimento, o que limita a contagem à técnica do número mais provável.

No enriquecimento é utilizada a Água Peptonada Alcalina (APA), com pH entre 8,4 e 8,6, tanto para *V. cholerae* como para V. *parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Na análise de *V. cholerae*, o período de incubação não deve ser muito prolongado, sob o risco de ocorrer um predomínio da microbiota competidora. O tempo recomendado é de 6-8h, porém, para alimentos processados, deve ser feito o plaqueamento com 6-8h e também após 18-21h. Alguns laboratórios optam pela incubação durante a noite (16-18h), para acomodar os trabalhos ao horário comercial. Essa prática, entretanto, é menos recomendável e deve ser evitada sempre que possível.

No plaqueamento diferencial, o meio mais amplamente utilizado é o Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS), especialmente desenvolvido para o isolamento de víbrios em geral. Esse meio explora a resistência à bile e a capacidade de crescer em condições alcalinas (pH 8,6) como principais características seletivas. A característica de diferenciação entre as espécies é a fermentação ou não da sacarose, cepas positivas produzindo colônias amarelas e cepas negativas produzindo colônias verdes. O TCBS é utilizado para o isolamento de *V. cholerae* (colônias amarelas) e *V. parahaemolyticus / V. vulnificus* (colônias verdes). *V. mimicus*, que é estreitamente relacionado ao *V. cholerae*, pode ser diferenciado no TCBS, pela incapacidade de fermentar a sacarose.

Para o isolamento preferencial de *V. vulnificus* são recomendados o Ágar Celobiose Polimixina Colistina Modificado (m-CPC) ou o Ágar Celobiose Colistina (CC), que utilizam a fermentação da celobiose a 39-40°C como característica diferencial. Vários outros vibrios e a maioria das cepas de *V. parahaemolyticus* não crescem nesses meios. Em função disso, são também recomendados como segundo meio de plaqueamento na análise de *V.cholerae*, para reduzir a

interferência dos outros vibrios. As cepas do biotipo clássico de *V. cholerae*, sensíveis à polimixina, não vão crescer no m-CPC, mas essas cepas são muito raras.

Na seleção inicial das cepas suspeitas, as características usadas são, primariamente, a produção de arginina dehidrolase, gás e H_2S, no Ágar Arginina Ferro (AIA). *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* apresentam o mesmo perfil negativo nesses testes, mas são diferenciados pela verificação da capacidade de crescer na ausência de NaCl (*V. cholerae* cresce, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* não crescem). A verificação da motilidade, forma, coloração de Gram e oxidase são os testes complementares utilizados nos três casos.

Na caracterização bioquímica é recomendado o uso do "kit" miniaturizado API 20E da BioMérieux, mas também são apresentadas provas bioquímicas que podem ser utilizadas em seu lugar. Para *V. cholerae*, teste do fio e testes de lisina e ornitina descarboxilase. Para *V. paeahaemolyticus* e *V. vulnificus*, teste de β-galactosidase (ONPG), teste de crescimento em diferentes concentrações de NaCl, testes de fermentação da celobiose e lactose, teste de urease e outros teste, a critério do laboratório, que sejam capazes de diferenciar essas espécies dos demais vibrios patogênicos. Os testes de indol, Voges Proskauer (VP) e lisina/ornitina descaroboxilase são adequados, mas outros testes podem ser selecionados, no Quadro 20.3.

Outros testes recomendados, relacionados mais diretamente com a patogenicidade dos isolados, são a caracterização sorológica das cepas identificadas como *V. cholerae*, para verificar se são dos sorotipos O1 ou O139 e a diferenciação dos subtipos Inaba, Ogawa e Ikojima. Para as cepas confirmadas como *V. parahemolyticus*, é a verificação da produção da TDH. Esse teste tradicionalmente é feito através da reação de Kanagawa no Ágar Wagatsuma, preparado com sangue fresco, humano, de carneiros ou de cães. Em função da dificuldade de obtenção de sangue fresco, esse teste tem sido substituído por testes moleculares (sondas genéticas ou reação de polimerase em cadeia) para o gene *tdh*, da hemolisina termoestável TDH.

20.2. MÉTODO APHA/BAM/FDA
Presença/ausência de *V.cholerae*

Método de análise de alimentos da Food and Drug Administration (FDA), descrito no capítulo 9 do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) Online (Kaysner & De Paola, 2004) e da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kaysner & De Paola, 2001). Aplica-se também à análise de água, conforme procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005).

Alimentos destinados à detecção de vibrios devem ser estocados sob resfriamento moderado (7-10ºC) e analisadas o mais rapidamente possível, porque a temperatura ótima de manutenção é de 15-18ºC e a maioria das cepas não sobrevive bem a 4ºC. O congelamento das amostras é desaconselhado e, em caso de absoluta necessidade, deve ser feito a 80ºC negativos.

Cuidado. A análise deve ser conduzida por pessoal bem treinado, para garantir a segurança do analista e do laboratório. Durante a realização das análises, recomendam-se os seguintes cuidados: 1) que todo o manuseio das amostras e meios de cultura seja feito sobre bandejas e não diretamente sobre as bancadas, 2) que nenhuma coleta de líquido seja feita com a boca e sim com pipetadores, 3) que ao trabalhar em capela de fluxo laminar se utilize um modelo vertical, adequado ao manuseio de patógenos, 4) que se mantenha ao alcance das mãos um frasco de desinfetante como solução de cloro a 100ppm ou solução de álcool iodado, para descontaminar

qualquer descarga inadvertida de material contaminado, 5) que todo o descarte de material seja precedido da descontaminação em autoclave a 121ºC/30min, 6) que toda a área de trabalho seja prontamente descontaminada, uma vez concluídas as análises, 7) que no preparo e homogeneização das amostras se tomem precauções para evitar a formação de aerossóis. Para tanto, recomenda-se que a homogeneização seja feita preferencialmente em "stomacher" e que, na homogeneização em liquidificador, a tampa seja protegida por papel amarrado com barbante, aguardando-se a acomodação do material homogeneizado, antes da abertura do frasco.

20.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Água Peptonada Alcalina (APA)
- Placas de Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS)
- Placas de Ágar Celobiose Polimixina Colistina Modificado (m-CPC) ou Ágar Celobiose Colistina (CC) (opcionais)
- Tubos de Ágar Arginina Ferro (AIA)
- Tubos de Ágar T1N1
- Tubos de Caldo T1N0 e T1N3 (mesma formulação do T1N1 sem ágar e com 0 e 3% de NaCl, respectivamente)
- Solução de desoxicolato de sódio 0,5% para teste do fio
- Solução salina 0,85% aquosa estéril
- Reagente de Kovacs para teste de oxidase
- Alça de platina ou palitos estéreis para teste de oxidase
- Anti-soro somático 01 e O139
- 'Kit"API 20E ou material para provas bioquímicas abaixo:
  - Tubos de Meio Teste de Motilidade
  - Tubos de Caldo Descarboxilase de Moeller com 1% de Lisina
  - Tubos de Caldo Descarboxilase de Moeller com 1% de Ornitina
  - Vaselina líquida ou óleo mineral estéril
- Anti-soros Inaba e Ogawa
- Ágar Sangue Nº 2 (opcional)
- Discos de Polimixina B 50 unidades (opcionais)
- Estufa incubadora regulada a 35±2ºC com termômetro calibrado
- Banho-maria regulado a 42±0,2ºC (para amostras de ostras) com termômetro calibrado

20.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema da análise de *V. cholerae* pelo método APHA/BAM/FDA encontra-se descrito na Figura 20.1. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na detecção da presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Enriquecimento

Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar 25g da amostra com 225ml de Água Peptonada Alcalina (APA). Incubar a 35±2ºC/6-8h e, no caso de alimentos processados, reincubar até completar 18-21h. Para a análise de amostras de ostras "in natura", homogeneizar uma segunda porção de 25g com 2.475ml de APA e incubar a 42±0,2ºC/18-21h em banho-maria com circulação forçada.

Nota a.1) Havendo interesse na enumeração, usar a técnica do Número Mais Provável (NMP): homogeneizar 25g da amostra com 225ml de Tampão Fosfato Salina (PBS). A partir dessa primeira diluição (10^{-1}), preparar diluições decimais até a 10^{-3} e inocular 1ml de cada diluição em séries de três tubos com 10ml de APA. Na análise de ostras "in natura", inocular uma série adicional de tubos de APA, para incubação a 42ºC.

Nota a.2) Para a análise de água, o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) não estabelece a quantidade de amostra na unidade analítica. Ajustar a concentração do caldo em função do volume inoculado, para manter a diluição 1:10. Por exemplo, para inocular 100ml da amostra, utilizar 100ml de APA em concentração dupla ou 50ml em concentração tripla.

b) Plaqueamento diferencial

A partir de cada frasco de enriquecimento, após 6-8h de incubação, coletar da película na superfície do meio, onde se concentra a massa de células, uma alçada do material, sem agitar o líquido. Estriar (estrias de esgotamento) em placas de Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) e reincubar os frascos até completar 18-21h (no caso de alimentos processados), repetindo então o plaqueamento diferencial. Incubar as placas de TCBS a 35±2ºC/18-24h.

Nota b.1) Para aumentar a probabilidade de isolamento de *V. cholerae*, pode ser incluído o plaqueamento em um meio seletivo adicional, como o Ágar Celobiose Polimixina Colistina Modificado (m-CPC) ou o Ágar Celobiose Colistina (CC), da mesma forma descrita para o TCBS. Incubar as placas de m-CPC ou CC a 39-40ºC/18-24h ou, na indisponibilidade de uma estufa a essa temperatura, a 35-37ºC/18-24h.

c) Confirmação preliminar

Selecionar para a confirmação três ou mais colônias típicas de cada placa. Em TCBS as colônias de *V. cholerae* são grandes, com 2-3mm, lisas, amarelas, planas com centro opaco e bordas translúcidas. Em m-CPC e CC são pequenas, lisas, opacas, verdes a roxas e desenvolvem um fundo roxo se a incubação for prolongada.

Repicar cada colônia em Ágar T1N1 inclinado e incubar a 35±2ºC/18-24h, para os testes de confirmação. Colônias não isoladas devem ser purificadas antes, por estrias de esgotamento em placas de Ágar T1N1, incubadas a 35±2ºC/18-24h. Submeter as culturas aos seguintes testes de confirmação:

Nota c.1) Os tubos de Ágar T1N1 podem ser substituídos por tubos de Meio Teste de Motilidade e usados como inóculo nos testes de confirmação. Nesse caso, o teste de motilidade é feito nessa etapa do ensaio e não precisa ser repetido no item d1.

Nota c.2) Para a análise de água o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) recomenda ainda, além dos testes descritos abaixo, o teste β-Galactosidase. Pode ser usado o mesmo procedimento descrito para *V. parahaemolyticus*, porém, não é necessário suplementar o Caldo ONPG com 2-3% de NaCl.

c1) Teste de crescimento em Ágar Arginina Ferro (AIA). A partir dos tubos de T1N1, inocular cada cultura em tubos de AIA inclinados, por picada e estrias na rampa. Incubar a 35±2ºC/18-24h, com as tampas afrouxadas e observar as características de crescimento. Cepas de *V. cholerae* e *V. mimicus* vão apresentar rampa alcalina (roxa), fundo ácido (amarelo), não produção de gás (ausência de bolhas) e não produção de H_2S (ausência de precipitado preto no meio de cultura).

c2) Teste de crescimento na presença/ausência de NaCl. A partir dos tubos de T1N1, inocular cada cultura em tubos de Caldo T1N0 e T1N3 (mesma formulação do T1N1, sem ágar e com 0 e 3% de NaCl, respectivamente). Incubar a 35±2ºC/18-24h e observar o crescimento. Cepas de *V. cholerae* e *V. mimicus* vão crescer na ausência de NaCl (T1N0).

Nota c.2) Para a análise de água o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005) recomenda ainda o teste de crescimento em 8% de NaCl, que pode ser feito em Caldo T1N8. Cepas de *V. cholerae* e *V. mimicus* não vão crescer nessa concentração.

c3) Teste do fio ("string test"). Transferir uma gota de solução de desoxicolato de sódio 0,5% para uma lâmina de vidro limpa e seca. A partir da cultura em T1N1, transferir uma alçada com inóculo pesado da cultura para a gota de desoxicolato de sódio e emulsionar bem. Em aproximadamente um minuto, as cepas de *V. cholerae* formam uma massa de material viscoso, que se estica quando puxado para cima com a alça, formando um fio que pode atingir 2-3cm de comprimento, antes de romper-se (lise das células e liberação do DNA).

c4) Teste de oxidase. Colocar um disco ou fita de papel de filtro no interior de uma placa de Petri e embeber o centro do papel com o reagente de Kovacs para teste de oxidase (solução aquosa 1% de cloridrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina). Com uma alça de platina ou palitos estéreis, remover uma pequena quantidade da cultura em T1N1 e espalhar sobre o reagente no papel, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor azul intensa, em aproximadamente 10 segundos (teste positivo). O não-desenvolvimento da cor azul no intervalo de um minuto indica teste negativo. As cepas de *V. cholerae* são oxidase positivas. Não devem ser utilizadas alças de níquel-cromo na transferência do inóculo para o teste de oxidase. Não considerar qualquer alteração da cor do reagente após um minuto de contato com a cultura.

c5) Teste de aglutinação com os anti-soros O1 e O139. Com um lápis de ponta hidrofóbica, demarcar três retângulos de aproximadamente 2x3cm em uma lâmina de vidro ou placa de Petri e, a cada área demarcada, adicionar uma gota de solução salina 0,85% aquosa estéril. Transferir uma alçada da cultura em T1N1 para uma das áreas demarcadas e emulsionar bem. Repetir esse procedimento nas outras áreas demarcadas e observar se ocorre auto-aglutinação. Em caso negativo, adicionar a uma das áreas demarcadas uma gota do anti-soro somático O1 polivalente e emulsionar. A uma das outras áreas, adicionar uma gota do anti-soro somático O139 e emulsionar. Sobre um fundo escuro iluminado, observar a formação de pontos de aglutinação, movimentando a lâmina em cuidadosos movimentos de inclinação e rotação, por um minuto. As cepas de *V. cholerae* desses sorotipos dão reação fortemente positiva com o respectivo anti-soro. Cepas não aglutinantes podem ser *V.cholerae* não O1/O139.

d) Confirmação definitiva

Submeter à confirmação definitiva apenas as culturas oxidase positivas, típicas em AIA, com teste do fio e teste de aglutinação O1 ou O139 positivos. Repicar cada cultura em um novo tubo de Ágar T1N1 inclinado, incubar a 35±2ºC/18-24h e utilizar a cultura de 24h para a realização das provas bioquímicas de confirmação.

Utilizar o "kit"de identificação API 20E (BioMeriéux), seguindo a orientação do fabricante. Alternativamente, realizar os testes descritos abaixo:

> **Nota d1)** Há cepas de *V. cholerae* não aglutinantes com os anti-soros O1/139 (NAG), que apresentam todas as demais reações típicas da espécie. Essas cepas, embora não provoquem cólera, podem provocar gastrenterites relativamente severas. As culturas NAG também podem ser submetidas à confirmação, para confirmar se pertencem à espécie.

d1) Coloração de Gram e teste de motilidade. A partir dos tubos de T1N1, inocular cada cultura em tubos de Meio Teste de Motilidade, por picada, e preparar um esfregaço para coloração de Gram. Incubar os tubos a 35±2ºC/18-24h e observar se houve migração com crescimento nas regiões distantes da picada (motilidade positiva) ou se o crescimento restringiu-se à linha da picada (motilidade negativa). As cepas de *V. cholerae* são bastonetes curvos ou retos, móveis, Gram negativos.

d2) Teste de lisina e ornitina descarboxilase. Transferir uma alçada com inóculo leve da cultura para tubos de Caldo Descarboxilase de Moeller suplementado com 1% do aminoácido a ser testado, desaerando os tubos imediatamente antes do uso. Cobrir a superfície do meio com uma camada de aproximadamente 1,5cm de vaselina líquida ou óleo mineral estéril e incubar a 35±2ºC/48h. As culturas fermentativas, como *V. cholerae*, inicialmente fermentarão a glucose presente, provocando a viragem ácida do meio, de roxo para amarelo. Posteriormente, se houver descarboxilação do aminoácido adicionado, os produtos alcalinos dessa reação neutralizarão a reação ácida anterior, revertendo a cor do meio para o roxo original (teste positivo). A não reversão da reação ácida indica teste negativo. As cepas de *V. cholerae* descarboxilam a lisina e a ornitina.

e) Diferenciação dos subtipos somáticos Inaba/Ogawa/Ikojima

Para as culturas identificadas com *V. cholerae* O1 ou O139 nos testes sorológicos e bioquímicos, realizar o teste de aglutinação com os anti-soros Inaba e Ogawa, da mesma forma descrita para o O1 e O139. Cepas do subtipo Inaba e Ogawa aglutinam com os respectivos anti-soros. Cepas do subtipo Ikojima aglutinam com ambos.

f) Diferenciação dos biotipos clássico e El Tor (opcional)

Para as culturas identificadas com *V. cholerae* O1 ou O139 nos testes sorológicos e bioquímicos, a diferenciação dos biotipos pode ser feita através dos testes de β-hemólise e sensibilidade à polimixina. Esses testes são opcionais, uma vez que o biotipo clássico é raramente encontrado.

f1) Teste de β-hemólise. Inocular uma placa de Ágar Sangue Nº 2 com as culturas suspeitas, tocando um ponto da superfície do meio, sem espalhar. Incubar a 35+2ºC/18-24h e observar se há formação de um halo transparente de hemólise em redor das colônias (teste positivo) ou não (teste negativo). As cepas do biotipo El Tor são β-hemolíticas e as do biotipo clássico não.

f2) Teste de sensibilidade à polimixina. Inocular cada cultura suspeita em uma placa diferente de Ágar T1N1 e colocar um disco de polimixina B de 50 unidades na superfície do meio. Incubar a 35±2ºC/18-24h e observar se há formação de uma zona de inibição em redor do disco de polimixina (sensível) ou não (resistente). As cepas do biotipo clássico são sensíveis, com zonas de inibição com diâmetro maior do que 12mm. As cepas do biotipo

El Tor são resistentes. Culturas isoladas das placas de m-CPC, que contém polimixina B, não precisam ser submetidas a esse teste, sendo consideradas do biotipo El Tor.

g) Interpretação dos resultados

Considerar como *V.cholerae* as culturas com todas as características morfológicas e bioquímicas típicas da espécie, incluindo as não aglutinantes (NAG) com os anti-soros O1 ou O139.

Considerar como *V.cholerae* O1 ou O139 as culturas com todas as características morfológicas e bioquímicas típicas da espécie e que aglutinaram com os anti-soros O1 ou O139. Na investigação de alimentos suspeitos de envolvimento na transmissão de cólera, essas cepas devem ser enviadas a um laboratório oficial de saúde pública, para verificação da enterotoxigenicidade.

20.3. MÉTODO APHA/BAM/FDA
Contagem (NMP) de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*

Método da Food and Drug Administration (FDA), descrito no capítulo 9 do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) Online (Kaysner & De Paola, 2004) e da American Public Health Association (APHA), descritas na 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kaysner & De Paola, 2001).

A estocagem das amostras e os cuidados na realização dos ensaios são os mesmos descritos para *V. cholerae*.

20.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Tampão Fosfato Salina (PBS)
- Água Peptonada Alcalina (APA)
- Placas de Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS)
- Placas de Ágar Celobiose Polimixina Colistina Modificado (m-CPC) ou Ágar Celobiose Colistina (CC)
- Placas e tubos inclinados de Ágar T1N1
- Tubos de Caldo T1N0 e T1N3 (mesma formulação do T1N1 sem ágar e com 0 e 3% de NaCl, respectivamente)
- Tubos de Meio Teste de Motilidade com 2-3% de NaCl
- Ágar Arginina Ferro (AIA) com 2-3% de NaCl
- Tubos de Caldo Tripticase de Soja (TSB) com 2-3% de NaCl
- Tubos de Ágar Tripticase de Soja (TSA) inclinados com 2-3% de NaCl
- "Kit" API 20E (BioMerieúx) e Solução de NaCl 2% estéril ou, alternativamente os seguintes meios e reagentes para provas bioquímicas:
  - Caldo O-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosídeo (Caldo ONPG) com 2-3% de NaCl
  - Caldo Triptona 1% com 0% NaCl
  - Caldo Triptona 1% com 3% NaCl
  - Caldo Triptona 1% com 6% NaCl
  - Caldo Triptona 1% com 8% NaCl
  - Caldo Triptona 1% com 10% NaCl
  - Meio de Oxidação Fermentação (OF) com 1% de D-celobiose e 2-3% de NaCl
  - Meio de Oxidação Fermentação (OF) com 1% de lactose e 2-3% de NaCl
  - Meio de Oxidação Fermentação (OF) com 1% de maltose e 2-3% de NaCl
  - Caldo Descarboxilase de Moeller com 1% de L-lisina e 3% de NaCl
  - Caldo Descarboxilase de Moeller com 1% de L-ornitina e 3% de NaCl

- Vaselina líquida ou óleo mineral estéril
- Caldo VM/VP com 2-3% de NaCl
- Caldo Uréia de Christensen com 2-3%NaCl
- Placas de Ágar Wagatsuma (opcional)
- Reagente de Kovacs para teste de oxidase
- Reagente de Kovacs para teste de indol
- Reagentes de Barrit para teste de VP

- Estufa incubadora a 35±2ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora a 39-40ºC ou, na indisponibilidade dessa a 35-37ºC com termômetro calibrado

20.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema da análise de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* pelo método APHA/BAM/FDA encontra-se descrito na Figura 20.2. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Enriquecimento

Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar 50g da amostra com 450ml de Tampão Fosfato Salina (PBS). A partir dessa diluição (10^{-1}), preparar diluições decimais até a 10^{-4} e inocular 1ml de cada diluição em séries de três tubos com 10ml de Água Peptonada Alcalina (APA). Incubar os tubos a 35±2ºC/18-24h.

Nota a1) Se as contagens esperadas são baixas, inocular também 10ml da diluição 10^{-1} em três tubos com 10ml de APA em concentração dupla.

b) Plaqueamento diferencial

A partir de cada frasco de APA com crescimento, coletar da película na superfície do meio, onde se concentra a massa de células, uma alçada do material, sem agitar o líquido. Para o isolamento de *V. parahaemolyticus*, estriar em placas de Ágar Tiossulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS). Para o isolamento de *V. vulnificus*, repetir o procedimento e estriar também em placas de Ágar Celobiose Polimixina Colistina Modificado (m-CPC) ou Ágar Celobiose Colistina (CC). Incubar as placas nas seguintes condições:

TCBS a 35±2ºC/18-24h

m-CPC ou CC a 39-40ºC/18-24h ou, na indisponibilidade de uma estufa a essa temperatura, a 35-37ºC/18-24h.

c) Confirmação preliminar

Selecionar para a confirmação três ou mais colônias típicas de cada placa: Em TCBS as colônias de *V. parahaemolyticus* são grandes, com 2-3mm, verdes ou azuladas, redondas e opacas. *V. vulnificus* também cresce produzindo colônias semelhantes. As colônias de *V. alginolyticus*, competidor nesse ensaio, são grandes, opacas e amarelas. Em m-CPC ou CC a maioria das cepas de *V. parahaemolyticus* não cresce e as que crescem produzem colônias verdes a roxas, características da não fermentação da celobiose. As colônias de *V. vulnificus* são amarelas, características da fermentação da celobiose.

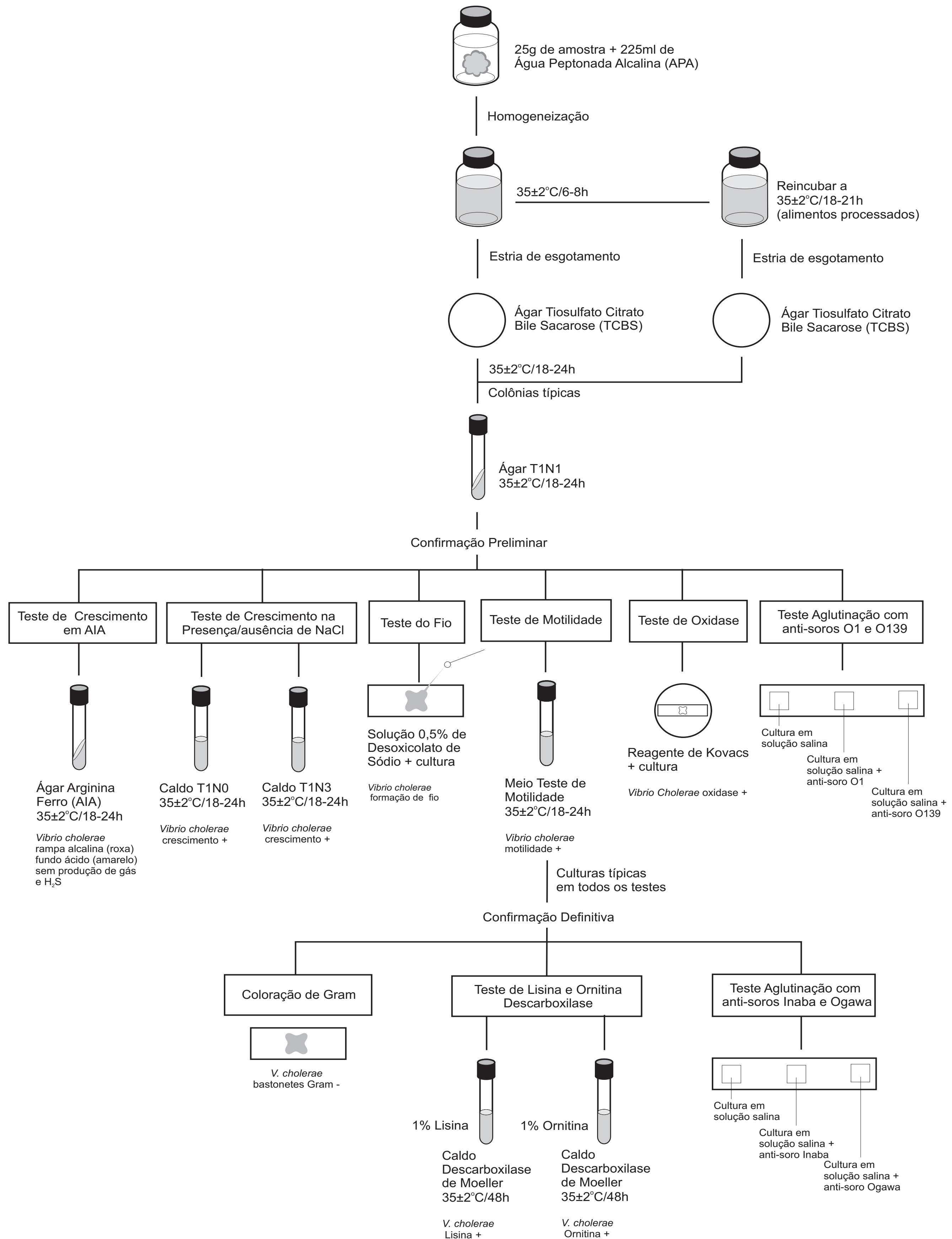


Figura 20.1. Esquema da análise de *V. cholerae* pelo método APHA/BAM/FDA

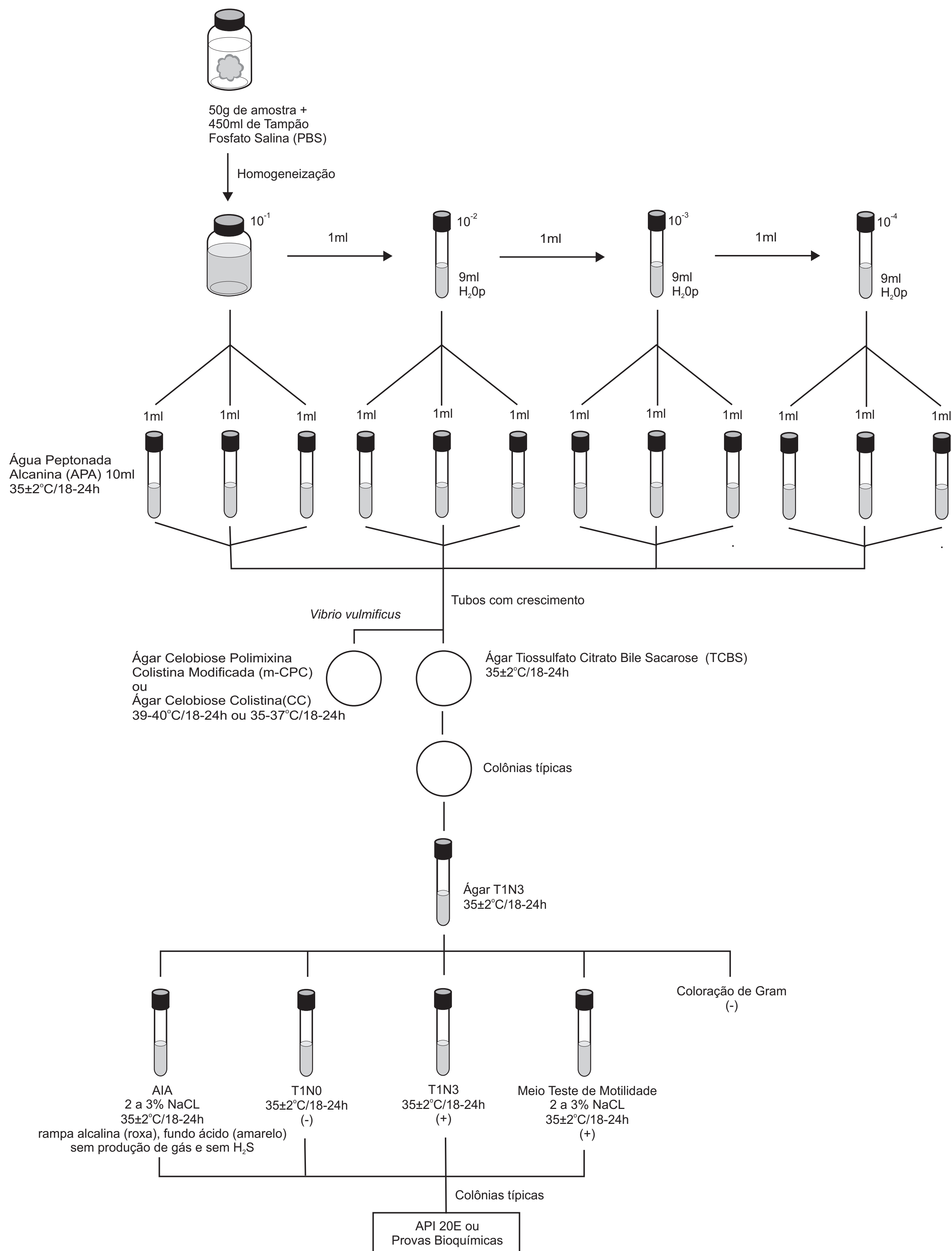


Figura 20.2. Esquema da análise de *V. parahaemolyticus e V. vulnificus* pelo método APHA/BAM/FDA.

Repicar cada colônia em Ágar T1N1 inclinado e incubar a 35±2ºC/18-24h, para os testes de confirmação. Colônias não isoladas devem ser purificadas antes, por estrias de esgotamento em placas de Ágar T1N1, incubadas a 35±2ºC/18-24h. Submeter as culturas aos seguintes testes de confirmação:

Nota c.1) Os tubos de Ágar T1N3 podem ser substituídos por tubos de Meio Teste de Motilidade com 2-3% de NaCl e usados como inóculo nos testes de confirmação preliminar. Nesse caso, o teste de motilidade não precisa ser repetido no item c3.

c1) Teste de crescimento em Ágar Arginina Ferro (AIA) 2-3% NaCl. Seguir o mesmo procedimento descrito para *V.cholerae*, mas ajustando a concentração de NaCl em 2-3% no Ágar Arginina Ferro. As cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* vão apresentar rampa alcalina (roxa), fundo ácido (amarelo), não produção de gás (ausência de bolhas) e não produção de H_2S (ausência de precipitado preto no meio de cultura).

c2) Teste de crescimento na presença/ausência de NaCl. Seguir o mesmo procedimento descrito para *V.cholerae*. As cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* não vão crescer na ausência de NaCl (T1N0).

c3) Coloração de Gram e teste de motilidade. Inocular cada cultura em tubos de Meio Teste de Motilidade (com a concentração de NaCl ajustada em 2-3%), por picada. Preparar também um esfregaço para coloração de Gram. Incubar os tubos a 35±2ºC/18-24h e observar se houve migração com crescimento nas regiões distantes da picada (motilidade positiva) ou se o crescimento restringiu-se à linha da picada (motilidade negativa). As cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são bastonetes curvos ou retos, móveis, Gram negativos.

d) Confirmação definitiva

Descartar as culturas com crescimento em T1N0, apenas as culturas dependentes do NaCl, típicas em AIA, Gram negativas e móveis requerem confirmação adicional. Repicar as culturas em tubos inclinados de Ágar Tripticase de Soja (TSA) e Caldo Tripticase de Soja (TSB), suplementados com 2-3% de NaCl. Incubar a 35±2ºC/18-24h para uso como inóculo nos testes de confirmação.

Para a confirmação definitiva, utilizar o "kit" API 20E (BioMeriéux), seguindo a orientação do fabricante. Para inoculação do API 20E, remover uma alçada da cultura em TSA e suspender em uma solução de NaCl 2%.

Alternativamente, realizar os testes bioquímicos descritos abaixo:

Nota d.1) Os testes de indol, VP, fermentação da maltose e lisina/ornitina descaroboxilase podem ser substituídos por outros testes, selecionados no Quadro 20.3, desde que a seleção permita diferenciar *V. parahemolyticus* ou *V. vulnificus* dos outros vibrios patogênicos.

d1) Teste de oxidase. A partir dos tubos de TSA, seguir o mesmo procedimento descrito para *V. cholerae*. As cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são oxidase positivas.

d2) Teste de β-Galactosidase (ONPG Teste). A partir dos tubos de TSA, inocular uma alçada com inóculo pesado de cada cultura em tubos de Caldo O-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosídeo (Caldo ONPG), com concentração de cloreto de sódio ajustada em 3%. Antes da inoculação, aquecer os tubos em banho a 37ºC, para dissolver os sais de fosfato que cristalizam durante a estocagem. Incubar a 35±2ºC/18-24h e observar se há ocorrência

de alteração da cor do meio de incolor para amarelo (hidrólise do ONPG, β-galactosidase presente, teste positivo) ou não (não utilização do ONPG, β-galactosidase ausente, teste negativo). As cepas de *V. parahaemolyticus* são negativas nesse teste. A maioria das cepas de *V. vulnificus* (85%) são positivas.

d3) Teste de halofilismo (crescimento em 0 - 6 - 8 e 10% de NaCl). A partir dos tubos de TSA, inocular uma alçada de cada cultura em tubos de caldo Triptona 1%, suplementado com a quantidade adequada de NaCl. Incubar a 35±2ºC/48h com agitação e observar se há ocorrência de crescimento. As cepas de *V. parahaemolyticus* não crescem na ausência de NaCl, crescem em 6% e usualmente também em 8%, mas não crescem em 10%. As cepas de *V. vulnificus* não crescem sem NaCl, crescem em 6% mas não em 8 ou 10%.

d4) Teste de fermentação de D-celobiose, lactose e maltose. Preparar tubos de Meio de Oxidação Fermentação (OF) com 1% do carboidrato a ser testado e concentração de NaCl ajustada em 2-3%. Imediatamente antes do uso, desaerar o meio fervendo por 15 minutos com as tampas desrosqueadas e resfriando imediatamente em banho de gelo. A partir dos tubos de TSA, inocular uma alçada de cada cultura nos tubos de OF, por picada. Incubar a 35±2ºC/48h e observar a ocorrência de viragem para amarelo (teste positivo) ou não (teste negativo) As cepas de *V. parahaemolyticus* fermentam a maltose e não fermentam a celobiose e a lactose. As cepas de *V. vulnificus* fermentam os três carboidratos.

d5) Teste de lisina e ornitina descarboxilase. A partir dos tubos de TSA, seguir o mesmo procedimento descrito para *V. cholerae*, porém, suplementar o caldo Descarboxilase de Moeller com 3% de NaCl. As cepas de *V. parahaemolyticus* descarboxilam a lisina e a maioria (95%) também a ornitina. As cepas de *V. vulnificus* descarboxilam a lisina e 55% também a ornitina.

d6) Teste de Voges-Proskauer. A partir dos tubos de TSA, inocular uma alçada de cada cultura em tubos de Caldo Vermelho de Metila Voges Proskauer (VM/VP), com a concentração de NaCl ajustada em 2-3%. Incubar os tubos a 35±2ºC/48h. Para a realização do teste de VP, adicionar a cada 2,5ml de cultura, na ordem indicada, 0,6ml do Reagente A (solução alcoólica 5% de α-naftol), 0,2ml do Reagente B (solução 40% de KOH), alguns cristais de creatina e agitar. O desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura, em aproximadamente 10-15 minutos, indica teste positivo. O não desenvolvimento da cor vermelha dentro de uma hora indica teste negativo. As cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* são VP negativas após 48h de incubação a 35ºC.

d7) Teste de indol. A partir dos tubos de TSA, inocular uma alçada de cada cultura em tubos de Caldo Triptona 1% com a concentração de NaCl ajustada em 3%. Incubar os tubos a 35±2ºC/48h. Para a realização do teste, adicionar a cada 3-4ml de cultura, cinco gotas do reagente de Kovacs para teste de indol (solução 5% de p-dimetilaminobenzaldeído) e observar o desenvolvimento de um anel vermelho na superfície do meio de cultura (teste positivo). A formação de um anel na cor amarelada do reagente indica teste negativo. As cepas de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* produzem indol.

d8) Teste de urease. Esse teste é requerido apenas para as culturas confirmadas como *V. parahaemolyticus* nos testes anteriores. A partir dos tubos de TSA, inocular uma alçada de cada cultura em tubos de Ágar ou Caldo Uréia de Christensen, com a concentração de

NaCl ajustada em 2-3%. Incubar os tubos a 35±2ºC/18-24h e observar a ocorrência de viragem alcalina para cor de rosa escuro ("pink") (teste positivo) ou não (teste negativo). Reincubar as culturas negativas por 24h adicionais e repetir a leitura. As maioria das cepas de *V. parahaemolyticus* são urease negativas (85%), porém, as cepas isoladas de espécimens clínicos na costa oeste dos Estados Unidos e nos países da Ásia têm-se mostrado predominantemente positivas. O teste de urease positivo é considerado como uma indicação de cepas potencialmente patogênicas.

e) Reação de Kanagawa

A verificação da reação de Kanagawa é opcional, sendo indispensável apenas para culturas isoladas de alimentos suspeitos de envolvimento em surtos de gastrenterite. Para a realização do teste, preparar placas de Ágar Wagatsuma, secar bem e dividir em setores demarcados no fundo, para a inoculação de várias culturas em uma mesma placa. A partir dos tubos de TSB previamente inoculados, transferir uma gota de cada cultura para os setores demarcados nas placas, sem espalhar, e aguardar que o líquido das gotas seja absorvido pelo meio de cultura. Incubar as placas a 35+2ºC/18h e observar se há ocorrência de um halo transparente de β-hemólise em redor das gotas, característico de teste positivo. Qualquer observação feita com mais de 24 horas de incubação não é válida para esse teste. A maioria das cepas patogênicas de *V. parahaemolyticus* apresenta reação de Kanagawa positiva.

Nota e.1) O procedimento acima é do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kaysner & DePaola, 2001), O BAM/FDA já não descreve esse teste, substituído por um teste de hibridização usando sonda genética para o gene *tdh*.

f) Cálculo dos resultados

A partir do número de tubos de APA confirmados, determinar o Número Mais Provável (NMP)/g ou ml da amostra, conforme a orientação do Capítulo 4.

20.4. REFERÊNCIAS

BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. **Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN0-306-47262-7).

HUNT, M.E. & RICE, E.W. Microbiological examination. In: EATON *et al.* (Eds), **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed**. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000, p.9.1-9.169.

INFORME-NET DTA, 2003a. *Vibrio cholerae*. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponível no site < http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_514COL.htm >, acesso em 17/02/06.

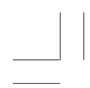
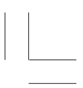
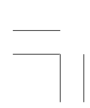
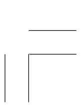
INFORME-NET DTA, 2003b. *Vibrio parahaemolyticus*. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponível no site < http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Vibrio_parah.htm>, acesso em 17/02/06.

INFORME-NET DTA, 2003c. *Vibrio vulnificus.* **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponível no site < http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Vibrios_vul.htm >, acesso em 17/02/06.

KAYSNER, C.A & DePAOLA, A. *Vibrio*. In: DOWNES, F. P. & K. ITO (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 40, p. 405-420.

KAYSNER, C.A & DePAOLA, A. *Vibrio.* In: In: U S Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Manual Online**, disponível no site <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>,acesso em 25/03/06. Chapter 9, revised May 2004.

KRIEG, N.R., HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1st Ed. Volume 1**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.

Capítulo 21

Yersinia enterocolitica

21.1. INTRODUÇÃO

Yersinia enterocolitica e *Yersinia pseudotuberculosis* são bactérias patogênicas cujas doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são classificadas pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002) no grupo de risco II, que inclui as doenças "de sério perigo, não representando ameaça de morte e normalmente não deixando seqüelas, mas incapacitando por períodos moderados".

Taxonomia

De acordo com a 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Bottone *et al.*, 2005), *Yersinia* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, definido como bastonetes a cocobacilos Gram negativos anaeróbios facultativos, oxidase negativos, catalase positivos e, usualmente, urease e nitrato redutase positivos. Fermentam a glicose com pouca ou nenhuma produção de gás e são psicrotróficos, com temperatura ótima de crescimento entre 28 e 29°C. Apresentam atividade bioquímica mais ativa a 28 do que a 37°C, sendo mais influenciadas pela temperatura as características de motilidade, produção de acetilmetilcarbinol (teste de VP), atividade de ornitina descarboxilase e β-galactosidase, produção de indol, utilização do citrato e fermentação de celobiose e rafinose, expressadas mais constantemente a 28°C. As principais características das onze espécies de *Yersinia*, destacando-se as respostas obtidas a 25-28 e a 37°C, encontram-se descritas no Quadro 21.1.

Y. enterocolitica é uma espécie heterogênea, cujas cepas podem ser subdivididas em biotipos (com base em caracteres bioquímicos) e sorotipos (com base em características sorológicas somáticas e flagelares). Vários esquemas de biotipagem foram desenvolvidos ao longo dos anos, muitos deles ultrapassados. Atualmente o *Bergey's Manual* divide as cepas em seis biotipos, com base nas características fenotípicas descritas no Quadro 21.2. A biotipagem e a sorotipagem são importantes nas investigações epidemiológicas, uma vez que nem todos os biotipos ou sorotipos são patogênicos. Por esse motivo, é recomendável que todas as cepas isoladas de alimentos suspeitos de envolvimento em surtos sejam encaminhadas a um laboratório de referência em *Yersinia*, familiarizado com os esquemas de biotipagem e sorotipagem correntes. Até o momento, os biotipos mais comumente implicados em surtos de yersiniose são:

Biotipo 4 do sorótipo 0:3 – infecções gastrointestinais na Europa, Canadá, África do Sul e, mais frequentemente, nos Estados Unidos.

Sorotipo O:8 – até hoje o mais freqüentemente isolados nos Estados Unidos, mas a freqüência tem diminuído, sendo esporadicamente relatado em outras partes do mundo também.

Sorortipo O:9 – é o segundo mais comum na Europa e Japão.

Quadro 21.1. Características das espécies de *Yersinia* na 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Bottone *et al.*, 2005).

Característica	*Y.pestis*	*Y.aldovae*	*Y.bercovieri*	*Y.enterocolitica*	*Y.frederiksenii*	*Y.intermedia*	*Y.kristensenii*	*Y.mollaretii*	*Y.pseudotuberculosis*	*Y.rohdei*	*Y.ruckeri*
Oxidase e Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina 37ºC	-	d	[+]	+	+	+	+	[+]	-	[-]	+
Ornitina 25-28ºC	-	+	+	+	+	+	+	+	-	[+]	+
Motilidade 37ºC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade 25-28ºC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[+]
Urease 37ºC	-	[+]	d	[+]	[+]	[+]	[+]	[-]	+	d	-
Urease 25-28ºC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-
Fenilalanina deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer 37ºC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer 25-28ºC	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Citrato Simmons 37ºC	-	-	-	-	[-]	-	-	-	-	-	-
Citrato Simmons 25-28ºC	-	d	-	-	d	-	-	-	-	[+]	-
Indol	-	-	-	V	+	+	V	-	-	-	-
Glicerol 37ºC	d	-	-	+	[+]	d	d	[-]	d	d	d
Glicerol 25-28ºC	d	+	[+]	+	+	+	+	+	+	[+]	d
Mioinositol 37ºC	-	-	-	d	[-]	[-]	[-]	-	-	-	-
Mioinositol 25-28ºC	-	+	d	d	-	[+]	d	d	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	d	d	+	+	+	+	+	+	-	+	d
Celobiose	-	d	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Adonitol[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose 37ºC	[-]	-	-	-	-	[+]	-	-	d	d	-
Melibiose 25-28ºC	d	-	-	-	-	+	-	-	+	d	-
Rafinose 37ºC	-	-	-	-	d	d	-	-	[-]	d	-
Rafinose 25-28ºC	-	-	-	-	-	+	-	-	[-]	d	-
L-rhamnose 37ºC	-	-	-	-	+	+	-	-	d	-	-
L-rhamnose 25-28ºC	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
Sacarose	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Salicina 37ºC	d	-	[-]	[-]	+	+	[-]	[-]	[-]	-	-
Salicina 25-28ºC	[+]	+	-	[-]	+	+	-	[-]	d	-	-
D-xilose 37ºC	+	d	+	d	+	+	[+]	d	+	d	-
D-xilose 25-28ºC	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-
Mucato 37ºC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mucato 25-28ºC	-	d	+	-	[-]	d	-	+	-	-	-
Hidrólise esculina 37ºC	d	-	[-]	[-]	[+]	[-]	-	-	+	-	-
Hidrólise esculina 25-28ºC	+	+	[+]	d	+	+	-	[-]	+	-	-
Lipase[a]	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	
Pirazinamidase	-	-	V	V	+	+	+	-	-	+	+

+ =90% ou mais cepas são positivas, - = 90% ou mais cepas são negativas, d = 11-89% das cepas são positivas, [+] = 26 a 75% das cepas positivas, [-] = 11 a 25% das cepas positivas, +/- = varia entre as cepas.

[a] Dados do *Bacteriological Analytical Manual* (Weagant *et al.*, 2001).

Quadro 21.2. Diferenciação dos biotipos de *Y. enterocolitica* (Bottone *et al.*, 2005).

Característica[a]	Biótipo					
	1A	1B	2	3	4	5
Atividade de lipase	+	+	-	-	-	-
Salicina ácido	+	-	-	-	-	-
Hidrólise da esculina	+/-	-	-	-	-	-
Xilose ácido	+	+	+	+	-	V
Trehalose ácido	+	+	+	+	+	-
Indol	+	+	V	-	-	-
Ornitina descarboxilase	+	+	+	+	+	+ (+)
Voges-Proskauer (VP)	+	+	+	+	+	+ (+)
Atividade de pirazinamidase	+	-	-	-	-	-
Sorbose ácido	+	+	+	+	+	-
Inositol ácido	+	+	+	+	+	+
Redução do nitrato	+	+	+	+	+	-
β-Glicosidase[b]	+	-	-	-	-	-

[a] Símbolos: + = positivo, - = negativo, (+) = lento, V = variável.

[b] Dados do *Bacteriological Analytical Manual* (Weagant *et al.*, 2001)

Epidemiologia

Três espécies de *Yersinia* são potencialmente patogênicas para o homem: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. *Y. pestis* é o agente causador da peste bubônica, porém não é comumente associada com alimentos. *Y. pseudotuberculosis* é ocasionalmente transmitida por alimentos, podendo provocar adenites mesentéricas que simulam apendicites agudas e, no caso de indivíduos com o sistema imunológico debilitado ou comprometido, também pode provocar septicemias severas. *Y. enterocolitica* é um patógeno de origem definitivamente alimentar, sendo encontrada em uma gama bastante variada de alimentos.

As características da doença, forma de transmissão, alimentos envolvidos e outras informações apresentadas abaixo são do *Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos*, do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) do Estado de São Paulo (Informe-Net DTA, 2003).

Yersiniose é o nome atribuído a uma gastroenterite veiculada por alimentos e causada por *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. Caracteriza-se por diarréia aguda e febre (principalmente em crianças jovens), dor abdominal e linfadenite mesentérica aguda, simulando apendicite (em crianças mais velhas e adultos). Em alguns casos podem ocorrer complicações como eritema nodoso (em cerca de 10% dos adultos, principalmente mulheres), artrite pós-infecciosa (em 50% dos adultos infectados) e infecção sistêmica. Pode também ocorrer diarréia sanguinolenta em 10 a 30% das crianças infectadas por *Y. enterocolitica*. A dose infectiva permanece ainda desconhecida e o período de incubação geralmente é de menos de dez dias, provavelmente três a sete dias. Os grupos de maior risco são crianças, indivíduos debilitados ou imunodeprimidos e idosos.

O reservatório são animais, principalmente suínos, que carregam *Y. enterocolitica* na faringe. *Y. pseudotuberculosis* é encontrada em várias espécies de aves e mamíferos, incluindo-se os roedores e outros pequenos mamíferos. Ambas espécies são encontradas em suínos, pássaros, esquilos, gatos e cães, mas apenas *Y. enterocolitica* tem sido detectada no ambiente (lagos, tanques) e alimentos. *Y. enterocolitica* não faz parte da flora normal humana, mas, tem sido isolada de fezes, feridas, escarro e linfonodos mesentéricos de seres humanos. *Y. pseudotuberculosis* tem sido isolada do apêndice doente de humanos. A distribuição é mundial, sendo mais comum no norte da Europa, Escandinávia e Japão, embora não muito freqüente. Estimativas apontam para a ocorrência de cerca de 17 mil casos, anualmente, nos Estados Unidos. No Brasil, não há dados.

A transmissão se dá pela via fecal-oral, através da água e alimentos contaminados, ou por contato com indivíduos ou animais infectados. *Y. enterocolitica* tem sido isolada de leite e derivados, carne e derivados, ovos e derivados, vegetais, pratos prontos de composição variada e, com mais freqüência, de produtos a base de carne suína. A refrigeração não reduz o risco de transmissão, porque *Y. enterocolitica* é psicrotrófica e se multiplica em alimentos refrigerados. A transmissão hospitalar também tem sido relatada, assim como a transmissão em transfusões de sangue, de doadores assintomáticos ou que tiveram gastroenterite leve.

Métodos de análise

Os métodos de detecção de *Yersinia* em alimentos são baseados na sua natureza psicrotrófica, que permite o enriquecimento em condições pouco seletivas, com incubação em baixas temperaturas. Exploram também outras características, como a resistência a concentrações relativamente altas de sais biliares, típica da família *Enterobacteriaceae* e a resistência a certas drogas, como a cefsulodina, a novobiocina e o irgasan. As cepas de *Yersinia* são mais resistentes às condições alcalinas do que as demais bactérias Gram negativas, característica explorada no tratamento do caldo de enriquecimento com solução de KOH 0,5%, por curto período de tempo. O método

descrito abaixo inclui uma etapa de enriquecimento no Caldo Peptona Sorbitol Bile (PSBB), que contem sais biliares, para inibir bactérias Gram positivas e sorbitol, para favorecer as Gram negativas capazes de utilizar esse açúcar álcool, como é o caso de *Yersinia enterocolitica*. A incubação é feita a 10°C por dez dias, favorecendo os psicrotróficos, seguindo-se uma etapa de tratamento com álcali, para eliminar a microbiota acompanhante não resistente. O isolamento é feito em dois meios de cultura, o Ágar MacConkey, de uso geral para enterobactérias, e o Ágar Cefsulodina Irgasan Novobiocina (CIN), desenvolvido especificamente para *Yersinia enterocolitica*. As colônias típicas desenvolvidas nesses meios são então selecionadas para a confirmação, através de uma bateria de testes bioquímicos.

21.2. MÉTODO APHA DE DETECÇÃO

Método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 41 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Weagant & Feng, 2001).

21.2.1 MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Enriquecimento e plaqueamento diferencial
- Caldo Peptona Sorbitol Bile (PSBB)
- Solução de hidróxido de potássio salina 0,5% (recém preparada)
- Placas de Ágar Cefsulodina Irgasan Novobiocina (CIN)
- Placas de Ágar MacConkey
- Estufa incubadora ajustada a 10°C
- Estufa incubadora ajustada a 30°C

Confirmação preliminar
- Tubos de Ágar Lisina Arginina Ferro (LAIA)
- Tubos de Ágar Uréia de Christensen
- Tubos ou placas de Ágar Bile Esculina
- Estufa incubadora ajustada a 22-26°C

Confirmação definitiva
- Ágar Gema de Ovo Anaeróbico (AEY)
- Caldo Infusão de Vitela
- Caldo Descarboxilase de Falkow com 0,5% de L-Lisina
- Caldo Descarboxilase de Falkow com 0,5% de L-Ornitina
- Caldo Descarboxilase de Falkow com 0,5% de L-Arginina
- Ágar Fenilalanina Deaminase
- Meio Teste de Motilidade
- Caldo Triptona
- Caldo VM-VP
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de manitol
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de sorbitol
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de celobiose
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de adonitol
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de inositol
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de sacarose
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de rhamnose

- Caldo Púrpura Base com 0,5% de rafinose
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de melibiose
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de salicina
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de trehalose
- Caldo Púrpura Base com 0,5% de xilose
- Ágar Citrato de Simmons
- Ágar Pirazinamidase
- Glicerol estéril
- Reagente de Kovacs para teste de oxidase
- Solução de cloreto férrico 10%
- Reagente de Kovacs para teste de indol
- Reagentes de Barrit para Teste de VP (solução α-naftol 5%, solução KOH 40%, cristais de creatina)
- Reagente de β-glicosidase (β-D-glicopiranosídeo)
- Solução de sulfato ferroso amoniacal 1% aquosa (recém preparada)
- Estufa incubadora a 35-37°C

21.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema da análise de *Yersinia enterocolitica* pelo método da APHA (Weagant & Feng, 2001) encontra-se descrito na Figura 21.1. Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 5, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na detecção da presença/ausência de microrganismos. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

Os alimentos destinados à detecção de *Y. enterocolitica* devem ser transportados e estocados sob refrigeração, não devendo ser congelados. A refrigeração não deve ser prolongada porque outras bactérias psicrotróficas também podem se multiplicar, dificultando o isolamento de *Yersinia*.

Cuidado. *Y. enterocolitica* é altamente infectiva e a detecção em alimentos deve ser conduzida por pessoal bem treinado, para garantir a segurança do analista e do laboratório. Recomenda-se que todo o manuseio de amostras suspeitas e de meios de cultura seja feito sobre bandejas e não diretamente sobre as bancadas. Que nenhuma coleta de líquido seja feita com a boca e sim com pipetadores e que, ao se trabalhar em capela de fluxo laminar, seja utilizado um modelo vertical, adequado ao manuseio de patógenos. Que se mantenha ao alcance das mãos um frasco de desinfetante como solução de cloro a 100ppm ou solução de álcool iodado, para descontaminar qualquer descarga inadvertida de material contaminado. Que todo o descarte de material seja precedido da descontaminação em autoclave a 121ºC/30min. Na preparação e homogeneização das amostras para a análise, é particularmente importante que se tomem precauções para evitar a inalação das células de *Yersinia* eventualmente presentes. Para tanto, recomenda-se que a homogeneização seja feita preferencialmente em "stomacher", que reduz o risco de formação de aerossóis e que, na homogeneização em liquidificador, a tampa do copo seja protegida por papel amarrado com barbante, aguardando-se a acomodação do material homogeneizado antes da abertura do frasco.

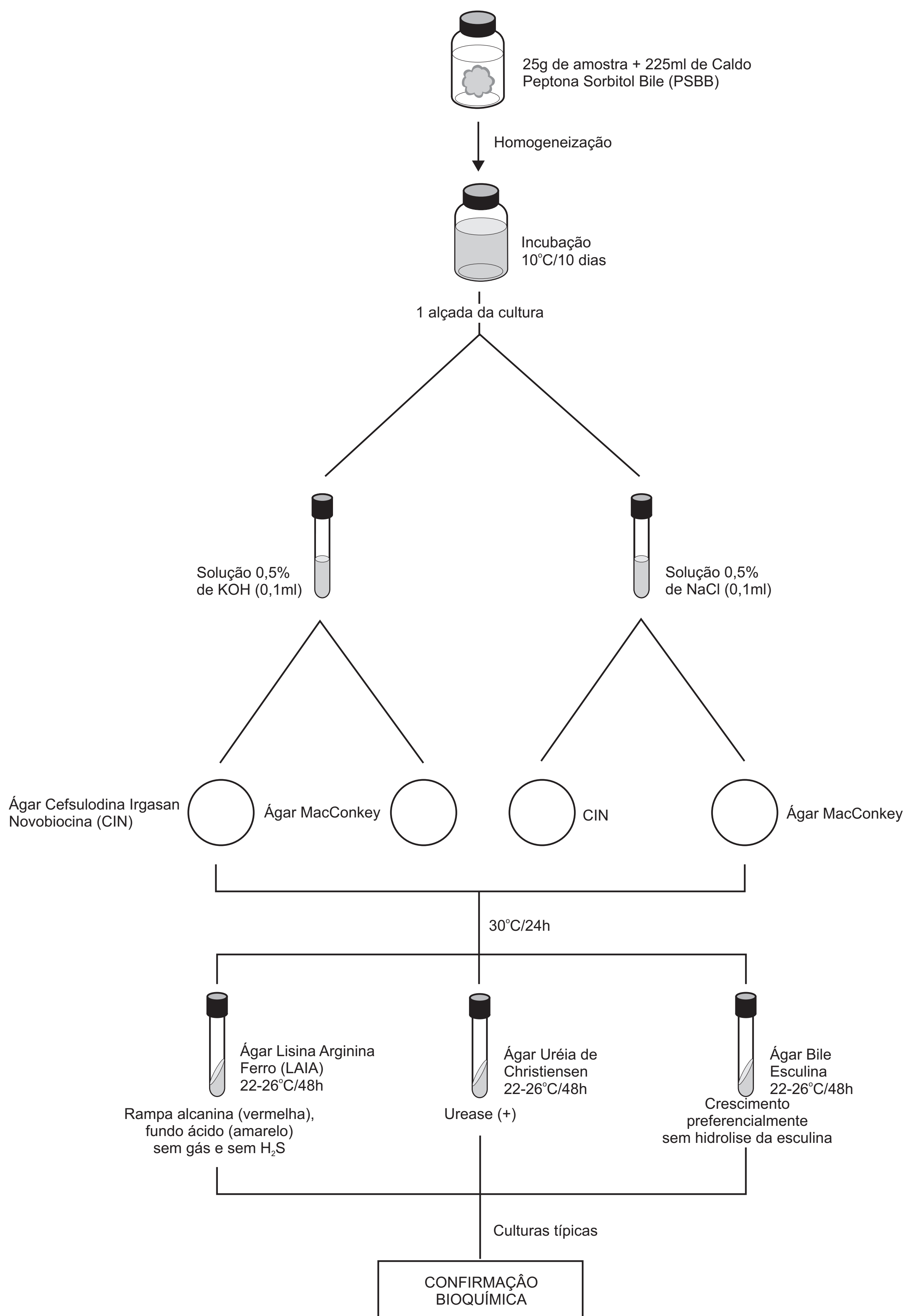


Figura 21.1. Esquema da análise de *Yersinia enterocolitica* pelo método da APHA (Weagant & Feng, 2001).

a) Enriquecimento

Seguindo as orientações do Capítulo 2, homogeneizar 25g da amostra com 225ml de Caldo Peptona Sorbitol Bile (PSBB). Incubar o caldo a 10ºC/10 dias.

b) Tratamento com KOH e plaqueamento diferencial

Transferir uma alçada da cultura obtida em PSBB para 0,1ml de solução de hidróxido de potássio salina 0,5% (solução 0,5% de KOH, preparada usando solução aquosa 0,5% de NaCl como solvente). Agitar bem por cinco segundos e estriar (estrias de esgotamento) uma alçada do material no Ágar Cefsulodina Irgasan Novobiocina (CIN) e uma alçada no Ágar MacConkey. Repetir esse procedimento substituindo a solução de KOH por uma solução aquosa 0,5% de NaCl e estriando o material nos mesmos meios. Incubar as placas a 30ºC/24h.

c) Confirmação preliminar

Selecionar duas ou mais colônias típicas de cada placa, para os testes de confirmação. No Ágar MacConkey, descartar todas as colônias vermelhas ou mucóides, *Y. enterocolitica* produz colônias pequenas (1-2mm em diâmetro), planas, incolores ou levemente rosadas. No Ágar CIN as colônias são pequenas (1-2mm), com centro vermelho-escuro e rodeadas por uma borda lisa incolor. Com o auxílio de uma agulha de inoculação, remover uma porção da massa de células, do centro da colônia típica e inocular os meios teste de confirmação preliminar, utilizando a mesma alçada para todos os meios. Não é necessário nem recomendável flambar a agulha e retirar outra porção da colônia, entre um meio e outro.

c.1) Teste de crescimento em Ágar Lisina Arginina Ferro (LAIA). Inocular cada colônia típica em um tubo de LAIA inclinado, por picada e estrias na rampa. Incubar os tubos a 22-26ºC/48h, com as tampas afrouxadas e observar as características de crescimento. As cepas de *Y. enterocolitica* vão apresentar rampa alcalina (vermelha), fundo ácido (amarelo), nenhuma produção de gás e não-produção de H_2S (ausência de precipitado preto no meio de cultura).

c.2) Teste de urease. Inocular cada colônia típica em um tubo de Ágar Uréia de Christensen inclinado e incubar a 22-26ºC/48h. A ocorrência de viragem alcalina na rampa, de rosa claro ou pêssego para rosa escuro, indica resultado positivo. Permanência do meio na cor original indica resultado negativo. As cepas de *Y. enterocolitica* são urease positivas.

c.3) Teste de crescimento em Ágar Bile Esculina. Inocular cada colônia típica em um tubo ou placa de Ágar Bile Esculina (picada) e incubar a 22-26ºC/48h. Crescimento indica resistência à bile e escurecimento do ágar indica hidrólise da esculina. As cepas de *Y. enterocolitica* crescem na presença de bile e podem hidrolisar ou não a esculina.

d) Confirmação definitiva

Submeter à confirmação definitiva as culturas urease positivas, com reações típicas em LAIA e, preferencialmente, que não hidrolizam a esculina.

d.1) Reação de lipase. Utilizar a cultura obtida em LAIA para inocular (estrias de esgotamento) uma placa de Ágar Gema de Ovo Anaeróbico (AEY) e incubar a placa a 22-26ºC por dois a cinco dias. Verificar a reação de lipase, indicada pelo desenvolvimento de colônias oleosas e iridescentes como pérolas, rodeadas por um anel de precipitação e por uma

zona clara e transparente, mais externa. Se estiver pura, utilizar a cultura em AEY para coloração de Gram e inoculação dos demais meios testes de confirmação abaixo.

Nota d.1. Plasmídio relacionados à virulência de *Yersinia* são facilmente perdidos nos repiques da cultura. Por esse motivo, é importante preservar as cepas suspeitas nessa etapa do ensaio, para eventuais testes posteriores de patogenicidade. Para tanto, inocular também um tubo de Caldo Infusão de Vitela, a partir da cultura em AEY, e incubar a 22-26ºC/48h. Após a incubação, adicionar glicerol estéril ao caldo, na quantidade necessária para concentração final 10%. Congelar imediatamente, preferencialmente a 70ºC negativos.

d.2) Teste de oxidase. Colocar um disco ou fita de papel de filtro no interior de uma placa de Petri e embeber o centro do papel com o reagente de Kovacs para teste de oxidase (solução aquosa 1% de cloridrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina). De preferência, utilizar discos ou tiras impregnados com o reagente, disponíveis comercialmente. Com uma alça de platina ou palitos estéreis (não utilizar alças de níquel-cromo), remover uma pequena quantidade da cultura e espalhar sobre o reagente no papel, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor azul intensa, em aproximadamente 10 segundos (teste positivo). O não-desenvolvimento da cor azul no intervalo de um minuto indica teste negativo. Não considerar qualquer alteração da cor do reagente após um minuto de contato com a cultura. O reagente de Kovacs é instável, devendo ser preparado no dia do uso. Havendo interesse em estocar, deve-se distribuir porções de 1-2ml em frascos escuros e manter sob congelamento (-20ºC) até o momento do uso. O descongelamento deve ser feito três a quatro horas antes do uso e todo o volume descongelado não utilizado deve ser descartado.

d.3) Teste de descarboxilação da lisina, ornitina e arginina. Inocular a cultura em Caldo Descarboxilase de Falkow suplementado com 0,5% do aminoácido a ser testado. Cobrir a superfície do caldo com óleo mineral estéril e incubar a 22-26ºC/72h. Observar a ocorrência de viragem ácida do indicador (cor amarela), indicativa de teste negativo ou não (teste positivo).

d.4) Teste de fenilalanina deaminase. Inocular a cultura em Ágar Fenilalanina Deaminase e incubar 22-26ºC/72h. Adicionar à cultura na rampa, duas ou três gotas de solução de cloreto férrico 10%. O desenvolvimento de uma cor verde indica teste positivo.

d.5) Teste de motilidade a 22-26 e 35-37ºC. Inocular a cultura em dois tubos de Meio Teste de Motilidade, com uma agulha de inoculação (não utilizar alça para esse teste). Incubar um tubo a 22-26ºC/72h e o outro a 35-37ºC/24h, observando se houve migração de células para regiões fora da linha de inoculação (motilidade positiva), ou se o crescimento restringiu-se à região da picada (motilidade negativa).

d.6) Teste de indol. Inocular a cultura em Caldo Triptona 1% e incubar a 22-26ºC/72h. Adicionar cinco gotas do reagente de Kovacs a cada 4ml de cultura e agitar levemente. Observar se há desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo) ou se o anel permanece na cor amarela do reagente (teste negativo)

d.7) Teste de Voges-Proskauer (VP). Inocular a cultura um tubo de Caldo VM-VP e incubar a 22-26ºC/48h. Para o teste de VP, transferir assepticamente 1ml da cultura para um tubo

de ensaio, adicionar 0,6ml de solução de α-naftol 5% e agitar. Adicionar em seguida 0,2ml de solução de KOH 40%, agitar e adicionar uma pitada leve de cristais de creatina, para acelerar a reação. Deixar descansar e observar periodicamente, por até quatro horas, o desenvolvimento de uma cor vermelha ou rósea no meio de cultura (teste positivo). A permanência do meio na cor do reagente (amarelada ou ligeiramente esverdeada) indica teste negativo.

d.8) Testes de fermentação de carboidratos. Inocular uma alçada de cada cultura em tubos de Caldo Púrpura Base suplementados com 0,5% dos seguintes carboidratos: manitol, sorbitol, celobiose, adonitol, inositol, sacarose, rhamnose, rafinose, melibiose, salicina, trehalose e xilose. Incubar a 22-26°C/72h e observar se ocorre produção de ácido, com viragem da cor do meio de roxo para amarelo (teste positivo), ou se o meio permanece na cor roxa original (teste negativo).

d.9) Teste de citrato. Inocular uma alçada com inóculo leve de cada cultura na rampa de tubos de Ágar Citrato de Simmons e incubar a 22-26°C/72h. Observar se há ocorrência de crescimento com viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio de verde para azul (teste positivo), ou não crescimento e não alteração de cor (teste negativo).

d.10) Teste de β-glicosidase. Preparar o reagente adicionando 0,1g de 4-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo em 100ml de solução aquosa 0,666M de fosfato monossódico (NaH_2PO_4) pH 6,0. Dissolver e esterilizar por filtração. Emulsionar uma alçada da cultura em salina fisiológica e ajustra para três na escala McFarland. Adicionar 0,75ml dessa suspensão a 0,25ml do reagente e incubar a 30°C uma noite. Observar o desenvolvimento de uma cor amarela (teste positivo) no meio de cultura ou não (teste negativo).

d.11) Teste de pirazinamidase. Inocular uma alçada na rampa do Ágar Pirazinamidase e incubar a 22-26°C/72h. Adicionar sobre a rampa 1ml de solução de sulfato ferroso amoniacal 1% aquosa (recém preparada) e observar. O desenvolvimento de uma cor rosa em 15min é indicativa da presença de ácido pirazinóico, formado por ação da enzima pirazinamidase (teste positivo). O não desenvolvimento da cor rosa indica teste negativo.

d.12) Teste de de autoaglutinação. Inocular a cultura em dois tubos de Caldo VM-VP. Incubar um tubo a 22-26°C/24h (pode ser o mesmo tubo usado no teste de VP) e o outro a 35-37°C/24h. As culturas presuntivas para presença de plasmídios virulentos vão apresentar as seguintes características: No tubo incubado a 22-26°C, apenas turvação normal de todo o caldo, decorrente do crescimento. No tubo incubado a 35-37°, aglutinação das células nas paredes ou no fundo do tubo e sobrenadante claro, sem turvação. Qualquer outra combinação de resultados nesses dois tubos é considerada negativa para a presença de plasmídios virulentos.

e) Interpretação dos resultados

As cepas de *Yersinia* são bastonetes Gram negativos oxidase negativos. Utilizar os Quadros 21.1 e 21.2 para determinar a espécie e o biotipo das cepas submetidas à confirmação.

21.3. REFERÊNCIAS

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2002. **Microrganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (ISBN0-306-47262-7).

INFORME-NET DTA, 2003. *Yersinia enterocolitica / Yersinia pseudotuberculosis*. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponível no site <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/yersi_entero.htm>, acesso em 17/02/06.

BOTTONE, E.J., BERCOVIER, H. & MOLARET, H.H., 2005. Genus XLI *Yersinia*. In: BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005. p. 838-848.

WEAGANT, S.D. & FENG, P. *Yersinia*. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 41, p.421-428.

WEAGANT, S.D., FENG, P. & STANFIELD, J.T., 2001. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: US Food and Drug Administration, **Bacteriological Analytical Manual Online** <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. Chapter 8.

Capítulo 22

Contagem de Esporos de Bactérias

22.1. INTRODUÇÃO

Esporos são estruturas de resistência das bactérias. Uma vez formados, permanecem em estado de dormência e, ao contrário das células vegetativas, não apresentam atividade metabólica e não se multiplicam. Entretanto, em condições favoráveis, podem germinar e dar origem a novas células vegetativas.

Os esporos são resistentes a condições ambientais que seriam letais para as células vegetativas. Suportam o congelamento, a desidratação, a irradiação, a presença de conservantes, o tratamento com desinfetantes e a exposição a altas temperaturas. Devido à resistência térmica, são particularmente deletérios nos alimentos submetidos ao processo de esterilização comercial, onde a microbiota competidora é eliminada pelo calor. Nos ingredientes desses produtos, devem ser controlados, porque contagens elevadas aumentam a probabilidade de sobrevivência e posterior germinação no alimento processado. Os ingredientes mais comumente utilizados na formulação de produtos comercialmente estéreis são leite cru, leite em pó, condimentos, amido, açúcar, frutas, sucos de frutas, vegetais e cereais.

A resistência térmica é avaliada através dos parâmetros D (tempo de redução decimal) e z (coeficiente de temperatura). O valor D, também chamado de razão letal, é definido como o tempo necessário para reduzir a 1/10 a população de um dado microrganismo, a uma dada temperatura. O valor z é definido como a variação de temperatura necessária para provocar uma variação de dez vezes no valor D, ou seja, promover uma redução ou uma elevação decimal no valor D. A esterilização comercial e os parâmetros D e z são discutidos no capítulo específico de esterilidade comercial.

22.1.1. TAXONOMIA DAS BACTÉRIAS ESPOROGÊNICAS IMPORTANTES EM ALIMENTOS

Fonte das informações: referências citadas no Quadro 22.1 e no texto abaixo. Atualização da nomenclatura: Euzéby (2006) e DSMZ (2006).

Até 1990, as bactérias esporogênicas associados com alimentos estavam restritas aos gêneros *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Bacillus* e *Sporolactobacillus*. Com o avanço dos estudos filogenéticos, entretanto, diversos novos gêneros foram criados, para classificar novas espécies e reclassificar espécies dos gêneros anteriores, que mostraram diversidade genética suficiente para separação. Dentre o total de gêneros esporogênicos existentes, os de ocorrência comum em alimentos encontram-se descritos abaixo e no Quadro 22.1.

Na maioria, as bactérias desses gêneros apresentam parede celular Gram positiva, mas, na coloração de Gram, podem mostrar-se Gram positivos, variáveis ou, mesmo, negativos. A morfologia é de bastonetes retos ou levemente curvos, com tamanhos variados.

Com relação ao requerimento de oxigênio para crescimento, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* e *Thermoanaerobacterium* são anaeróbios estritos e não crescem na presença de oxigênio. Os demais são aeróbios, a maioria incluindo tanto espécies aeróbias estritas, que não crescem na ausência de oxigênio, como espécies anaeróbias facultativas, que crescem tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. *Sporolactobacillus* é anaeróbio facultativo, mas cresce melhor em atmosfera microaerófila.

Com relação à temperatura de crescimento, os gêneros *Alicyclobacillus*, *Geobacillus*, *Desulfotomaculum* e *Thermoanaerobacterium* são classificados como termófilos. O gênero *Bacillus*, embora inclua hoje espécies predominantemente mesófilas, ainda aloca espécies termófilas facultativas. O termo termófilo facultativo é usado, no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Stevenson & Segner, 2001), principalmente para diferenciar *Geobacillus stearothermophilus*, termófilo estrito que não cresce abaixo de 37°C, de *Bacillus coagulans*, termófilo facultativo que cresce bem a 30-35°C e também a 55°C.

Bacillus Cohn 1872

Os bacilos são bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes, Gram positivas, móveis e, usualmente, catalase positivas. Utilizam carboidratos com produção de ácidos, mas raramente produzem gás. É um gênero bastante heterogêneo, incluindo espécies psicrotróficas, espécies mesófilas e espécies termófilas facultativas (que crescem abaixo de 40ºC e também a 50 ou 55ºC). A maioria tem pH ótimo na faixa neutra, mas algumas espécies são acidúricas e algumas são alcalofílicas. A resistência térmica dos esporos varia com as espécies e, em alguns casos, entre as cepas de uma mesma espécie.

Várias espécies de *Bacillus* são encontradas em alimentos. As mais importantes são *B. cereus* (discutido em capítulo específico), *B. coagulans*, *B. smithii* e *B. sporothermodurans* (discutidos nesse capítulo).

B. coagulans. É uma espécie conhecida há décadas, mas sua descrição foi corrigida por De Clerck *et al.* (2004), porque muitas cepas isoladas e identificadas como *B. coagulans*, ao longo dos anos, foram posteriormente reclassificadas como *Bacillus smithii*, *Bacillus licheniformis* ou *Geobacillus stearothermophilus*. É termófilo facultativo, crescendo entre 30 e 57-61°C, mas não a 65°C. Levemente acidúrico, cresce em valores de pH na faixa de 4,0 a 10,5-11,0, com ótimo em 7,0. A morfologia é de bastonetes, Gram positivos, móveis. Esporogênico, embora nem todas as cepas produzam esporos facilmente. Os esporos são elipsoidais, mas em alguns casos, parecem esféricos. A localização é subterminal ou, ocasionalmente, paracentral ou terminal, com leve dilatação do esporângio. O valor $D_{121,1°C}$ varia entre 0,01 e 0,07min (Stumbo, 1973). Catalase positivo, anaeróbio facultativo, utiliza carboidratos com produção de ácido láctico, sem gás. Provoca deterioração tipo "flat sour", assim chamada porque a produção de ácido, sem gás, resulta em embalagens não estufadas. Atinge principalmente derivados de tomate, mas também tem sido implicado na deterioração de produtos lácteos, frutas e vegetais.

B. smithii. É uma espécie nova, proposta por Nakamura *et al.* (1988) para reclassificar cepas anteriormente classificadas como *B. coagulans*. É termófilo facultativo, crescendo entre 25 e 60°C, a maioria das cepas também a 65°C. Cresce em pH 5,7 mas não em 4,5 ou abaixo. A morfologia é de bastonetes, Gram positivos, móveis. Esporogênico, em Ágar Nutriente com Manganês (ANMn)

forma esporos ovais ou cilíndricos, terminais ou subterminais, sem dilatação ou com dilatação leve do esporângio. Catalase e oxidase positivo, anaeróbio facultativo, utiliza carboidratos com produção de ácido, sem gás ("flat sour"). Isolado de leite evaporado, enlatados, queijos e caldo de beterraba para produção de açúcar.

Quadro 22.1. Principais características dos gêneros e espécies de bactérias esporogênicas associados com alimentos.

Gênero ou espécie (referências)	Coloração de Gram	Motilidade	Forma e posição dos esporos[a]	Dilatação esporângio	Requerimento de O_2[b]	Catalase	Produção de gás	Temperatura crescimento em°C (ótima)	pH de crescimento (ótimo)
Gênero *Alicyclobacillus* (11, 12, 13, 14, 15)	+ ou variável	+/-	NR	NR	Aer/Fac	+/-/fraca	-	<20 a 70 (35 a 60)	0,5 a 6,5 (1,5 a 5,5)
A. acidiphilus (18)	+	+	EL/OV T/ST	+	Aer	+	-	20 a 55 (50)	2,5 a 5,5 (3,0)
A. acidocaldarius (8, 11, 15, 16, 44)	+	NR	EL T/ST	+/-	Aer	fraca	-	45 a 70 (53 a 60)	2,0 a 6,0 (4,0)
A. acidoterrestris (11, 15, 17, 43)	+/variável	+	OV C/T/ST	+/-	Aer/Fac	fraca	-	20a 62 (42 a 53)	2,0 a 6,0 (3,5 a 5,0)
A. pomorum (12)	+	+	OV ST	+	Aer	+	-	30 a 60 (45 a 50)	3,0 a 6,0 (4,5 a 5,0)
Gênero *Aneurinibacillus* (23, 25, 26, 27)	+/Variável	+	EL/OV C/PC/ST	+/-	Aer	+/-/fraca	-	20 a 65 (35 a 55)	3,5 a 9,0 (5,0 a 7,0)
Gênero *Bacillus* (2, 8)	+	+	OV/ES/CL/EL C/ST/PC/T	+/- ou leve	Aer/Fac	maioria +	maioria -	varia	varia
B. coagulans (39, 40)	+	+	EL/ES ST/PC/T	leve	Fac	+	-	30 a 57 - 61 (40 a 57)	4,0 a 11,0 (7,0)
B. sporothermodurans (41, 42)	irregular	+	EL T	-	Aer	+	NR	20 a 55 (37)	NR
B. smithii (45)	+	+	OV/CL T/ST	- ou leve	Fac	+	-	25 a 60 - 65	>4,5 a <7,7
Gênero *Brevibacillus* (23, 24, 25)	+/- ou variável	+	EL/OV	+	Aer/Fac	+/-/fraca	-	10 a 55 (28 a 45)	4,5 a 8,5 (5,0 a 7,5)
Gênero *Clostridium* (2, 8)	usual/e +	usual/e +	OV/ES C/ST/T	usualmente +	Anaer	maioria -	+/-	maioria (30 a 37)	maioria (6,5 a 7,0
C. acetobutylicum (8, 48)	+	+/-	OV ST	leve	Anaer	-	+	(37)	NR
C. algidicarnis (52)	+	-	OV T	+	Anaer	NR	-	4 a 37 (25 a 30)	NR
C. beijerinckii (8, 48)	+	+	OV C a ST	+	Anaer	-	+	10 a 50 (37)	NR
C. bifermentans (8, 48)	+	+	OV C a ST	usualmente +	Anaer	-	+	10 a 50 (30 a 37)	NR
C. botulinum Tipo I (ABF) (8, 46, 47)	+	usual/e +	OV ST	+	Anaer	-	+	10 - 12 a 48 (35 a 40)	>4,6 e <8,5
C. botulinum Tipo II (BEF) (8, 46, 47)	+	+	OV C a ST	usualmente+	Anaer	-	+	3,3 a 45 (28 a 30)	>5,0 e <8,5
C. butyricum (8, 48)	+	+/-	OV C/ST	usualmente +	Anaer	-	+	10 a 50 (30 a 37)	NR
C. estertheticium subsp. *laramiensis* (49, 50)	+	+	OV T	+	Anaer	-	+	-3 a 21 (15)	4,5 a 7,5 (6,5)
C. estertheticium subsp. *estertheticum* (50, 51)	+	+	OV=EL ST a C	leve	Anaer	NR	+	1 a 13 (6 a 8)	5,5 a 7,8 (6,5 a 7,2)
C. frigidicarnis (54)	+	+	EL ST	+	Anaer	NR	+	3,8 a 40,5 (30 a 38,5	4,7 a 9,5 (6,4 a 7,2)
C. gasigenes (53)	+	+	EL ST	leve	Anaer	NR	+	-1,5 a 26 (20 a 22)	5,4 a 8,9 (6,2 a 8,6)
C. hystolyticum (8, 48)	+	+/-	OV C/ST	leve ou -	Anaer	-	+	10 a 50 (37)	NR
C. putrefaciens (8, 48)	+	-	ES/OV ST/T	+	Anaer	-	-	0 a 30 (15 a 22)	5,8 a 8,5 (6,2 a 7,4)
C. pasteurianum (8, 48)	+	+/-	OV ST	+	Anaer	-	+	(37)	NR
C. sporogenes (8, 48)	+	+/-	OV ST	+	Anaer	-	+	10 a 50 (30 a 40)	NR
C. tyrobutyricum (8, 48)	+	+/-	OV ST	+	Anaer	-	+	(30 a 37)	NR

Quadro 22.1. Continuação

Gênero ou espécie (referências)	Coloração de Gram	Motilidade	Forma e posição dos esporos[a]	Dilatação esporângio	Requerimento de O_2[b]	Catalase	Produção de gás	Temperatura crescimento em °C (ótima)	pH de crescimento (ótimo)
Gênero *Desulfotomaculum* (1, 2 ,3, 4)	- ou +	+/-	OV/ES T/ST/C	+	Anaer	-	NR	20 a 70 (30 a 55)	(7,0 a 8,7)
D. nigrificans (1, 2, 10)	-	+	OV T/ST	+	Anaer	-	-	43 a70 (55)	6,2 a 7,8 (6,8 a 7,3)
Gênero *Geobacillus* (19, 21, 22)	+/-	+/-	EL/CL T/ST	+/-	Aer/Fac	maioria +	-	30 a 80 (55 a 65)	5,5 a 8,5 (6,2 a 7,5)
G. pallidus (20, 22)		+			Fac	+		30 a 70 (NR)	min 6,0
G. stearothermophilus (19, 20)	+	+			Aer/Fac	-	-	37 a 70 (60 a 65)	5,5 a 8,0 (neutro)
Gênero *Paenibacillus* (31 a 38)	+/- ou variável	+ ou NR	EL/OV/CL T/ST/PC/C	maioria +	Aer/Fac	+/-	+/-	0 - 5 a 50 - 55 (10 a 40)	4,5 a 12,0 (6,5 a 7,7)
P. lactis (35)	-/variável	+	EL/CL ST/PC	leve	Aer	NR	-	max 50 - 55 (30 a 40)	5,6 a 11,0 (7,0)
P. macerans (8, 31, 35)	+	NR	OV T/ST	+	Fac	+	+	10 a 50 (30)	(7,0)
P. polymyxa (8, 31, 35)	+	NR	OV C/ST	+	Fac	+	+	5 a 40 (30)	(7,0)
Gênero *Sporolactobacillus* (2, 30)	+	maioria +	EL/OV T	+	Microaer	-	-	15 - 45 (35)	NR
Gênero *Thermoanaerobacterium* (5, 6, 7)	variável/ -	maioria +	OV/ES T ou NR	+ ou NR	Anaer	-	+	35 a 75 (55 a 70)	3,8 a 8,5 (5,2 a 7,2)
T. thermosaccharolyticum (6, 8, 9)	-	+/-	OV/ES T	+	Anaer	-	+	37 a 62 (55 a 60)	4,7 a 8,5 (6,2 a 7,2)
T. thermosulfurigenes (5, 6)	-	+	ES	+	Anaer	-	+	55 a 75 (≥60)	4,0 a 7,6 (5,5 a 6,5)
Gênero *Virgibacillus* (28, 29)	+/variável	+	EL/ES T/ST/C	+	Aer/Fac	+	-	5 a 50 (28 a 37)	NR

[a] Esporos: C = Central, CL = cilíndrico, EL = elipsoidal, ES = esférico, O = oval, PC = paracentral, ST = subterminal, T = terminal

[b] Requerimento de O_2: Aer = Aeróbio estrito, Fac = Anaeróbio facultativo, Anaer = Anaeróbio estrito, Microaer = Microaerófilo.
NR = Não relatado

Referências:

1) Campbell & Postgate (1965)
2) Holt *et al*. (1994),
3) Pikuta *et al*. (2000)
4) Vandieken *et al*. (2006)
5) Lee *et al*. (1993)
6) Liu *et al*. (1996)
7) Cann *et al*. (2001)
8) Sneath *et al*. (1986)
9) Ashton & Bernard (2001)
10) Donnelly & Hannah (2001)
11) Wisotzkey *et al*. (1992)
12) Goto *et al*. (2003)
13) Karavaiko *et al*. (2005)
14) Simbahan *et al*. (2004)
15) Albuquerque *et al*. (2000)
16) Deinhard *et al*. (1987)
17) Pinhatti *et al*. (1997)
18) Matsubara *et al*. (2002)
19) Nazina *et al*. (2001)
20) White *et al*. (1993)
21) Nazina *et al*. (2005)
22) Banat *et al*. (2004)
23) Shida *et al*. (1996)
24) Logan *et al*. (2002)
25) Allan *et al*. (2005)
26) Heyndrickx *et al*. (1997)
27) Goto *et al*. (2004)
28) Heyrman *et al*. (2003)
29) Yoon *et al*. (2005)
30) Yanagida *et al*. (1997)
31) Shida *et al*. (1997)
32) Meehan *et al*. (2001)
33) Uetanabaro *et al*. (2003)
34) Montes *et al*. (2004)
35) Scheldeman *et al*. (2004)
36) Horn *et al*. (2005)
37) Saha *et al*. (2005)
38) Lim *et al*. (2006)
39) DeClerck *et al*. (2004)
40) De Vecchi & Drago (2006)
41) Pettersson *et al*. (1996)
42) Scheldeman *et al*. (2006)
43) Evancho & Walls (2001)
44) Brown (1995)
45) Nakamura *et al*. (1988)
46) ICMSF (1996)
47) Hauschild (1989)
48) Scott *et al*. (2001)
49) Kalchayanand *et al*. (1993)
50) Spring *et al*. (2003)
51) Collins *et al*. (1992)
52) Lawson *et al*. (1994)
53) Broda *et al*. (2000)
54) Broda *et al*. (1999)

B. sporothermodurans. É uma espécie nova, proposta por Pettersson *et al.* (1996). Aeróbio estrito, catalase e oxidase positivo, não produz ácido nem gás a partir de uma variedade de açúcares, incluindo glicose, lactose, galactose e frutose. Não cresce ou cresce muito pobremente em Ágar Nutriente (NA), sendo melhor cultivado em Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) suplementado com vitamina B12 (1mg/l). Mesófilo, cresce entre 20 e 50°C, menos freqüentemente a 55°C, com temperatura ótima de 37°C. As células são móveis, longas e filamentosas, com coloração de Gram irregular e aparência de granular, lembrando um colar de pérolas. Forma esporos elipsoidais, terminais, sem dilatação do esporângio. Os esporos são raramente vistos nos meios de cultura de laboratório. Isolado de leite e outros produtos lácteos, esterilizados pelo processo UHT ou convencional. No leite esterilizado, as células vegetativas atingem contagem de 10^5/ml e os esporos de 10^3/ml. Não provocam alteração do pH e, usualmente, também não alteram as características sensoriais do produto. Os esporos apresentam resistência térmica anormalmente alta, em

comparação com outras espécies mesófilas de *Bacillus*. O valor $D_{121^{o}C}$ é de 2,25min, ligeiramente inferior ao de *Geobacillus stearothermophilus*, que é termófilo estrito e a mais resistente das bactérias esporogênicas aeróbias. Em temperaturas mais altas, como as utilizadas no processo UHT do leite, é extremamente resistente. O valor $D_{140^{o}C}$ é de cinco segundos, enquanto o de *G. stearothermophilus* é de 0,9 segundos. Não é uma espécie comum no leite cru ou no ambiente das fazendas produtoras de leite, parecendo ter sido introduzidas através de concentrados nutritivos utilizados na alimentação do gado leiteiro. Os esporos dessas cepas não apresentam a mesma resistência observada nas cepas isoladas de produtos processados, havendo evidências de que a maior resistência foi decorrente da adaptação às condições do processo UHT.

Outros *Bacillus*. Dados levantados por Scheldeman *et al.* (2005) destacaram *B. licheniformis* e *B. subtilis* entre as espécies de *Bacillus* mais freqüentes em leite cru, equipamentos e outras amostras de fazendas de produção leiteira. O isolamento foi obtido tanto a 20 quanto a 37 e a 55ºC. Em ingredientes de alimentos comercialmente estéreis (açúcar, amido, cereais, condimentos, leite em pó, cacau, gelatina, tomate e outros vegetais), Richmond & Fields (1966) destacaram, além de *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans* e *B. pumilus* como as mais frequentes. O isolamento foi feito a 55ºC, não sendo utilizada outra temperatura. Dados levantados por Kalogridou-Vassiliadou (1992) destacaram o envolvimento de *B. licheniformis* e *B. subtilis* em casos de deterioração tipo “flat sour” de leite evaporado. Dados levantados por Scheldeman *et al.* (2006) destacam o envolvimento de *B. sphaericus* e *B. licheniformis* na contaminação de leite esterilizado pelo processo UHT ou convencional.

Clostridium Prazmowski 1880

Os clostrídios são bactérias anaeróbias estritas, em forma de bastonetes, com parede celular Gram positiva e coloração de Gram positiva ou variável. Usualmente são móveis e, na maioria, catalase negativos. As espécies patogênicas veiculadas por alimentos são *C. botulinum* (discutido nesse capítulo) e *C. perfringens* (discutido em capítulo específico). Além dessas, Scott *et al.* (2001) destacam três grupos importantes como deteriorantes: os clostrídios proteolíticos (putrefativos), os clostrídios sacarolíticos (não proteolíticos) e os clostrídios, psicrófilos ou psicrotróficos deteriorantes de carnes embaladas à vácuo refrigeradas.

***C. botulinum*.** É uma espécie de grande risco para a saúde pública, porque produz toxinas altamente potentes, causadoras de botulismo. Segundo o CVE (2002), as toxinas atuam no sistema nervoso e são letais por ingestão, na dose de 1/100 a 1/120ng. Termolábeis, são destruídas pelo aquecimento à 65-80ºC/30min ou 100ºC/5min. A doença é provocada pela ingestão de alimentos contaminados com a toxina, caracterizando-se por manifestações neurológicas seletivas, de evolução dramática e alta taxa de mortalidade. Pode iniciar-se com vômitos e diarréia (mais comumente com constipação), debilidade e vertigem. Em seguida são observadas alterações da visão (visão turva, visão dupla, fotofobia), flacidez das pálpebras, modificações da voz (rouquidão, afonia, fonação lenta), distúrbios da deglutição, flacidez muscular generalizada, dificuldade de movimentos, agitação psicomotora e outras alterações relacionadas com os nervos cranianos. Esse quadro resulta em dificuldade respiratória e cardiovascular, levando à morte por parada cárdio-respiratória.

Em função das propriedades antigênicas das toxinas produzidas, as cepas de *C. botulinum* foram classificadas em oito tipos (A, B, C1, C2, D, E, F, G). Dados da International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1996) indicam que o **tipo A** atinge humanos e frangos, sendo mais comum em partes da América do Norte e nos países da antiga União Soviética. É o tipo mais encontrado nos casos de botulismo relatados no Brasil (CVE, 2006). Os

veículos mais comuns são conservas caseiras de vegetais, frutas, carnes e peixes. O **tipo B** atinge humanos, bovinos e eqüinos, sendo mais comuns na América do Norte, Europa e países da antiga União Soviética (cepas não proteolíticas). Os veículos mais comuns são carnes preparadas, particularmente suína. Os **tipos C e D** atingem aves aquáticas, bovinos e equinos, mas não humanos. O **tipo E** atinge humanos e peixes e os veículos mais comuns são pescados e frutos do mar. Ocorre principalmente em regiões de alto consumo desses produtos, incluindo Japão, Dinamarca, Suécia, Alasca, Labrador e países da antiga União Soviética. O **tipo F** atinge humanos, sendo mais comum na Dinamarca, América do Norte, América do Sul e Escócia. Os veículos mais freqüentes são produtos cárneos. **O tipo G** foi isolado do solo na Argentina e não há surtos confirmados de botulismo provocado por esse tipo em humanos. Nunca foi encontrado em alimentos e, em1988, foi reclassificado como *C. argentinense*.

Em função das características metabólicas, as cepas são divididas em quatro grupos (I, II, III, IV). Todos apresentam morfologia de bastonetes retos ou levemente curvos, Gram positivos, usualmente móveis, catalase negativos. Produzem esporos ovais, subterminais, usualmente com dilatação do esporângio. Nenhum cresce em pH abaixo de 4,6. **As cepas do Grupo I** produzem toxinas dos tipos A, B ou F, são proteolíticas e lipolíticas, fermentam glicose com produção de ácido e gás e não fermentam manose. Produzem esporos ovais, subterminais, com dilatação do esporângio. Os esporos desse grupo são os mais resistentes, dentre as cepas de *C. botulinum.* O valor $D_{121,1ºC}$ relatado em diferentes substratos varia entre 0,05 e 0,32min. A temperatura mínima para crescimento é de 10-12ºC e a ótima de 35 a 40ºC. Não crescem na presença de 10% de NaCl (atividade de água 0,9353). Sob condições ótimas de temperatura e atividade de água, o pH mínimo para crescimento é de 4,6. A multiplicação é caracterizada por odor pútrido e produção de gás. **As cepas do Grupo II** produzem toxinas dos tipos B, E ou F, são sacarolíticas, lipolíticas, não proteolíticas e fermentam glicose e manose com produção de ácido e gás. Produzem esporos ovais, centrais a subterminais, com dilatação do esporângio. Os esporos são menos resistentes ao calor do que os do Grupo I. O valor $D_{82,2ºC}$ relatado em diferentes substratos varia entre 0,25 e 73,61min. A temperatura ótima é de 28-30ºC e a mínima de 3,3ºC, havendo relatos de crescimento sob refrigeração. Não crescem na presença de 5% de NaCl (atividade de água 0,9707). Sob condições ótimas de temperatura e atividade de água, o pH mínimo para crescimento é de 5,2. A multiplicação é caracterizada por produção de gás, mas sem odor pútrido. **As cepas do Grupo III** produzem toxinas dos tipos C1, C2 ou D, são lipolíticas, podem ser proteolíticas ou não e fermentam glicose e manose com produção de ácido e gás. A temperatura mínima para crescimento é de 15ºC e não crescem na presença de 3% de NaCl. **As cepas do Grupo IV** (*C. argentinense*) produzem toxina do tipo G, são proteolíticas e não lipolíticas. Não fermentam glicose ou manose, não crescem na presença de mais de 3% de NaCl e têm temperatura mínima de 12ºC para crescimento.

Os esporos de *C. botulinum* são amplamente distribuídos na natureza, podendo ocorrer em quase todos os alimentos, incluindo os de origem vegetal e os de origem animal. Muitos alimentos já foram implicados na transmissão, incluindo embutidos cárneos, doces, hortaliças e legumes em conserva (palmito, aspargo, cogumelos, alcachofra, pimentão, beringela, alho, picles, etc.), peixes, frutos do mar, e outros. Um levantamento feito pelo Food Safety Inspection Service do United States Department of Agriculture (FSIS/USDA, 1997) apresenta casos ocorridos em vários países, envolvendo conservas de pimenta em óleo, carne cozida, salmão, atum, sopas, cogumelos e outros. Embora não cresça em alimentos ácidos, o envolvimento esporádico de conservas acidificadas em casos de botulismo têm sido relatadas. No levantamento do FSIS/USDA (1997), a principal causa desses eventos é a multiplicação de outros microrganismos no produto, elevando o pH até a faixa de crescimento de *C. botulinum.*

No Brasil, o Centro de Referência do Botulismo (CR BOT), criado em 1999 e sediado na Central de Vigilância Epidemiológica (Disque CVE), do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), relatou a ocorrência de 30 casos de botulismo entre 1999 e 2006 (CVE, 2006). Alguns casos foram confirmados clinicamente mas não foram determinados os alimentos envolvidos. Nos demais casos, foram envolvidos palmito industrializado em conserva, jurubeba em conserva, carne de porco em conserva caseira, patê de fígado, patê de fígado de porco caseiro, chouriço industrializado, tofu (uma espécie de queijo feito de soja) fermentado em conserva e torta de frango com requeijão (assada em supermercado e mantida à temperatura ambiente até a venda e também na residência do consumidor). Nos alimentos ou espécimens clínicos analisados, foram encontradas as toxinas A e/ou B, com predomínio do tipo A.

Clostrídios proteolíticos. Os clostrídios proteolíticos (putrefativos) são capazes de decompor proteínas, peptídeos e aminoácidos anaerobicamente, produzindo compostos sulfurosos com odor pútrido. Além de *C. botulinum* tipos A e B, outras espécies freqüentemente associadas a alimentos são *C. sporogenes*, *C. bifermentans*, *C. putrefasciens* e *C. hystolyticum*. Essas espécies não crescem em pH menor do que 4,6 e, com exceção de *C. putrefaciens*, são mesófilas, crescendo entre 10 e 50°C, com temperatura ótima entre 30 e 40ºC. *C. putrefaciens* é psicrotrófico, crescendo entre 0 e 30°C, com ótima entre 15 e 22ºC. A morfologia é de bastonetes retos Gram positivos, exceto *C. putrefasciens*, que forma longos filamentos curvos. Gram positivos, móveis ou imóveis, catalase negativos, esporulam facilmente em meio de carne cozida. Formam esporos ovais (*C. putrefaciens* ovais ou esféricos), mais freqüentemente subterminais, mas também podendo apresentar localização central ou terminal. Podem dilatar ou não o esporângio. Os esporos são relativamente resistentes ao calor, *C. sporogenes* apresentando valor $D_{121,1°C}$ entre 0,1 e 1,5min (Stumbo, 1973). *C. bifermentans* e *C. sporogenes* produzem ácido acético e grande quantidade de gás hidrogênio durante o crescimento. *C. hystolyticum* produz quantidades moderadas de hidrogênio e não produz ácidos a partir de carboidratos. *C. putrefasciens* não produz ácidos nem hidrogênio a partir de carboidratos. Podem deteriorar qualquer tipo de alimento com pH 4,8 ou acima, sendo a principal causa da deterioração de enlatados de baixa acidez subprocessados. A condição clássica encontrada nesses produtos é o estufamento e o odor pútrido, mas alteração sem gás também pode ocorrer.

Clostrídios sacarolíticos. Os clostrídios sacarolíticos não digerem proteínas e fermentam carboidratos com produção de ácidos butírico e acético, além de dióxido de carbono e hidrogênio. As espécies mais comuns em alimentos são *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii* e *C. acetobutylicum*, capazes de crescer em pH 4,2-4,4 e deteriorar enlatados levemente ácidos (derivados de tomate e frutas pouco ácidas). Mesófilos, a temperatura ótima de crescimento varia de 30 a 40°C. São bastonetes Gram positivos e formam esporos ovais, centrais ou subterminais, usualmente com dilatação do esporângio. Os esporos são pouco resistentes ao calor, comparados aos dos putrefativos, sendo mais comuns na deterioração por contaminação pós-processo (vazamento) do que por subprocessamento. O crescimento é caracterizado por odor butírico e produção de gás.

Clostrídios psicrófilos ou psicrotróficos deteriorantes de carnes embaladas à vácuo refrigeradas. Os primeiros relatos associando clostrídios psicrófilos à deterioração de carnes refrigeradas embaladas a vácuo foram publicados por Dainty *et al.* (1989) e Kalchayanand *et al.* (1989). As cepas isoladas foram posteriormente caracterizadas como novas espécies, sendo denominadas *Clostridium esterthetícum* (Collins *et al.*, 1992) e *Clostridium laramie* (Kalchayanand *et al.* 1993). Estudos posteriores demonstraram estreita relação entre essas cepas, que foram reclassificadas em uma única espécie, dividida em duas subspécies - *Clostridium estertheticum* subsp. *estertheticum* e *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* (Spring *et al.* 2003). Ambos são psicrófilos verdadeiros, a subsp. *estertheticum* com

temperatura ótima de crescimento de 6 a 8ºC, temperatura máxima de 13ºC e mínima de 1ºC. A subsp. *laramiensis* cresce na faixa de 3ºC negativos a 21ºC positivos, com ótima de 15ºC. São batonetes Gram positivos móveis, esporogênicos e os esporos resistem ao tratamento térmico a 80ºC/10min mas não a 90ºC/10min. São sacarolíticos e os principais produtos de fermentação de *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* são os ácidos butírico e acético (proporção 4:1) e os gases hidrogênio (30%) e CO_2 (70%). Além disso produzem também butanol, butil butanoato, butil acetato e uma complexa mistura de esteres e compostos sulfurosos, principalmente H_2S e metanotiol. Na fermentação de *C. estertheticum* subsp. *laramiense* predominam o ácido butírico, o 1-butanol e os gases hidrogênio e CO_2, produzindo ainda ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico e etanol. A deterioração de carnes embaladas a vácuo, chamada de "blown-pack", não está relacionada à condições de abuso de temperatura, ocorrendo em produtos estocados sob condições adequadas de refrigeração. Provoca odor desagradável e estufamento acentuado das embalagens. Na deterioração por *C. estertheticum* subsp. *estertheticum*, o odor imediatamente detectado na abertura das embalagens é descrito como sulfuroso, mudando para odor de fruta e odor de solvente, após 5min de exposição à temperatura ambiente. Nos 10min seguintes passa a forte odor de queijo e odor butanoico.

Em 1994 foi relatado o isolamento de uma nova espécie de *Clostridium* de amostras deterioradas de carne de porco cozida, refrigerada e embalada a vácuo, denominada *Clostridium algidicarnis* (Lawson *et al.* 1994). Essa espécie é psicrotrófica, com temperatura ótima na faixa de 25 a 30ºC, máxima de 37ºC e mínima (testada) de 4ºC. Sacarolítico, fermenta carboidratos com produção de ácidos, predominando butírico e acético, mas sem produção de gás. A deterioração é caracterizada por odor nauseante, sem estufamento das embalagens.

Uma terceira nova espécie de *Clostridium* deteriorante de carne embalada a vácuo, refrigerada em condições de abuso de temperatura, foi relatada em 1999, denominada *Clostridium frigidicarnis* (Broda *et al.* 1999). Essa espécie é psicrotrófica, com temperatura ótima na faixa de 30-38,5ºC, máxima de 40,5ºC e mínima de 3,8ºC. É sacarolítica, fermentando carboidratos com produção de ácido acético, butírico, láctico e outros, etanol e gases hidrogênio e CO_2. A deterioração em carnes embaladas a vácuo é do tipo "blown-pack".

A quarta nova espécie de *Clostridium* deteriorante de carne refrigerada embalada a vácuo foi relatada em 2000, denominada *Clostridium gasigenes* (Broda *et al.* 2000). Essa espécie é psicrotrófica, com temperatura ótima na faixa de 20-22ºC, máxima de 26ºC e mínima de 1,5ºC negativos. É sacarolítica, fermentando carboidratos com produção de etanol, ácido acético, butírico e láctico, esteres butíricos e gases hidrogênio e CO_2. A deterioração em carnes embaladas a vácuo é do tipo "blown-pack", embora com estufamento menos acentuado do que o causado por *C. estertheticum.* A deterioração não está relacionada à condições de abuso de temperatura, ocorrendo em produtos estocados sob condições adequadas de refrigeração.

Sporolactobacillus Kitahara and Suzuki 1963

Os esporolactobacilos são bactérias anaeróbias facultativas, cujo crescimento é favorecido em atmosfera microaerófila, com 5% de dióxido de carbono. A morfologia é de bastonetes, usualmente móveis, com coloração de Gram positiva. Formam esporos elipsoidais ou ovais, terminais, com dilatação do esporângio. São catalase e oxidase negativos. Fermentam hexoses com produção de ácido lático, não produzem gás e dependem da presença de um carboidrato fermentável para crescer. Crescem em temperaturas na faixa de 15 a 45ºC, com ótimo em 35ºC. O limite de pH para crescimento não é bem estabelecido, mas crescem em pH 5,0 e, possivelmente, também em 4,5.

Com exceção da formação de esporos, os esporolactobacilos são muito semelhantes aos *Lactobacillus.* Não crescem ou crescem muito pobremente em Ágar ou Caldo Nutriente (NA, NB) e crescem bem na maioria dos meios de cultura de *Lactobacillus.* A formação de esporos é rara na maioria dos meios. Os esporos resistem a 10min de exposição a temperaturas de 70 a 80°C, mas não a 90°C. Banks (1989) relata o valor $D_{90°C}$ de *S. inulinus* entre 4 e 7min, mas destaca que a importância dessas bactérias em alimentos ainda não está bem estabelecida. Há poucos relatos de isolamento em produtos como picles, suco de laranja concentrado, produtos lácteos e, também, em mostos fermentados.

Desulfotomaculum Campbell and Postgate 1965

O gênero *Desulfotomaculum* foi criado por Campbell & Postgate (1965), para acomodar as bactérias esporogênicas anaeróbias capazes de reduzir sulfato, produzindo sulfeto de hidrogênio (H_2S). *Desulfotomaculum nigrificans* foi designado como a espécie tipo.

São bastonetes retos ou curvos, com parede celular Gram positiva, mas coloração de Gram variando entre positiva e negativa. Podem ser móveis ou imóveis e produzem esporos ovais ou esféricos, terminais, subterminais ou centrais, com dilatação do esporângio. Anaeróbios estritos, catalase negativos, apresentam metabolismo respiratório, mas utilizam sulfato, sulfito ou outros compostos de enxofre como aceptores de elétrons, reduzidos a H_2S. Apresenta espécies mesófilas e espécies termófilas, com temperatura de crescimento entre 20 e 70°C e ótima entre 30 e 55°C. O pH ótimo varia entre 7,0 e 8,7.

D. nigrificans. Anteriormente chamado *Clostridium nigrificans*, essa espécie é reconhecida como contaminante e deteriorante de alimentos comercialmente estéreis. As células são bastontes e apresentam coloração de Gram negativa. Forma esporos ovais, terminais ou subterminais, com dilatação do esporângio. É termófilo estrito, crescendo na faixa de 43 a 70°C, com ótimo em 55°C. O pH de crescimento varia entre 6,2 e 7,8, com ótimo entre 6,8 e 7,3. Os esporos são altamente resistentes ao calor, com $D_{121,1°C}$ = 2 a 3min (Stumbo, 1973). Donnelly & Hannah (2001) destacam o açúcar e o amido como as principais fontes desse microrganismo em alimentos. Nos produtos enlatados, provocam deterioração sulfidrica, com escurecimento do conteúdo interno das embalagens, sem estufamento. O escurecimento é causado pela reação do H_2S com o ferro das latas. Não é uma ocorrência comum, acontecendo quando o produto permanece por tempo prolongado a temperaturas elevadas, permitindo a germinação de esporos sobreviventes. Pode ser causada por resfriamento lento e/ou estocagem em temperaturas superiores a 43°C (vending machines).

Alicyclobacillus Wisotzkey *et al.* 1992, gen. nov.

Esse gênero foi proposto por Wisotzkey *et al.* (1992), para reclassificar as espécies de *Bacillus* termófilas e acidófilas, com composição da membrana celular típica, contendo principalmente ácidos graxos ω-alicíclicos. A descrição do gênero foi emendada por Karavaiko *et al.* (2005), quando espécies anteriormente classificadas como *Sulfobacillus* foram transferidas para o gênero *Alicyclobacillus.* Com essa alteração, nem todas as espécies contém esse tipo e ácido graxo e nem todas são termófilas, com descrito originalmente.

São bastonetes móveis ou imóveis, com parede celular Gram positiva e coloração Gram positiva ou variável. Aeróbios estritos ou anaeróbios facultativos. Acidófilos estritos, crescem em pH na faixa de 0,5 a 6,5, com ótimo entre 1,5 e 5,5. A temperatura de crescimento varia na faixa de 4 a 70°C, com ótimo entre 35 e 60°C. Catalase positivos ou negativos, produzem ácido mas não gás a partir de carboidratos.

A espécie de maior importância em alimentos é *A. acidoterrestris.* Outras espécies que também são contaminantes de produtos ácidos são *A. acidocaldarius*, *A. acidiphilus* e *A. pomorum.*

A. acidoterrestris. Anteriormente chamado de *Bacillus acidoterrestris,* é termófilo facultativo, crescendo entre 20 e 62ºC, com temperatura ótima na faixa de 42 a 53ºC. Acidófilo cresce na faixa de pH entre 2,0 e 6,0, com ótimo entre 3,5 e 5,0. As células são bastonetes Gram positivos ou variáveis, móveis e produzem esporos ovais, centrais, subterminais ou terminais, podendo dilatar ou não o esporângio. Os esporos podem sobreviver ao tratamento térmico aplicado a produtos ácidos ($D_{95ºC}$ = 1,64 em suco de maçã pH 3,6). Descrito como aeróbio, embora algumas cepas possam ser anaeróbias facultativas. A maioria das cepas é catalase positiva (fraca). Produz ácido mas não gás a partir de carboidratos, sendo considerado um “flat-sour” típico. Originário do solo e comum nas frutas “in natura”, tem sido isolado de sucos e concentrados de frutas. A deterioração provoca sabor estranho, odor descrito como “medicinal” ou “fenólico”, resultante da produção de guaiacol durante o crescimento. Não deteriora sucos concentrados com Brix acima de 30º, mas os esporos permanecem viáveis.

A. acidocaldarius. Anteriormente chamado *Bacillus acidocaldarius*, é termófilo estrito, crescendo entre 45 e 70ºC, com temperatura ótima na faixa de 53 a 60ºC. Acidófilo cresce na faixa de pH entre 2,0 e 6,0, com ótimo em 4,0. As células são bastonetes Gram positivos e produzem esporos elipsoidais, terminais ou subterminais, podendo dilatar ou não o esporângio. Aeróbio estrito, catalase positivo (fraco), produz ácido mas não gás a partir de carboidratos. Não parece ser um deteriorante freqüente, havendo poucos relatos de sua presença em alimentos ácidos, tais como suco e concentrado de manga esterilizados pelo processo UHT (Gouws *et al.*, 2005).

A. acidiphilus. É uma espécie nova, descrita por Matsubara *et al.* (2002). Termófilo facultativo, cresce entre 20 e 55ºC, com temperatura ótima de 50ºC. Acidófilo cresce na faixa de pH entre 2,5 e 5,5, com ótimo em 3,0. As células são bastonetes Gram positivos, móveis. Forma esporos elipsoidais ou ovais, terminais ou subterminais, com dilatação do esporângio. Aeróbio estrito, catalase positivo, produz ácido mas não gás a partir de carboidratos. Isolado de refrescos ácidos deteriorados com odor de guaiacol, produzido durante o crescimento.

A. pomorum. É uma espécie nova, descrita por Goto *et al.* (2003). Termófilo facultativo, cresce entre 30 e 60ºC, com temperatura ótima na faixa de 45 a 50ºC. Acidófilo cresce na faixa de pH entre 3,0 e 6,0, com ótimo entre 4,5 e 5,0. As células são bastonetes Gram positivos, móveis. Forma esporos ovais, subterminais, com dilatação do esporângio. Aeróbio estrito, catalase positivo, produz ácido mas não gás a partir de carboidratos. Isolado de suco misto de frutas (laranja, maçã, manga, abacaxi e framboesa) deteriorado.

Thermoanaerobacterium Lee *et al.* 1993, gen. nov.

Esse gênero foi proposto por Lee *et al.* (1993), para reclassificar as espécies de *Clostridium* caracteristicamente termófilas e sacarolíticas.

São bastonetes móveis ou imóveis, com estrutura de parede celular Gram positiva ou negativa e coloração de Gram negativa ou variável. Nem todas as espécies produzem esporos, nas condições testadas até o momento.

Anaeróbios estritos, catalase negativos, sacarolíticos, fermentam carboidratos com produção de gás. São termófilos estritos, com temperatura mínima de 35ºC, máxima de 75ºC e ótima entre 55 e 70ºC. O pH de crescimento varia na faixa de 3,8 a 8,5, com ótimo entre 5,2 e 7,2.

A espécie de maior importância em alimentos comercialmente estéreis é *T. thermosaccharolyticum.* O envolvimento das outras espécies de *Thermoanaerobacterium* com alimentos não é clara. *T. polisaccharolyticum* e *T. zeae* são espécies novas, descobertas no resíduo orgânico do

processamento de milho verde e outros vegetais enlatados (Cann *et al.*, 2001). Entretanto, nas condições testadas pelos autores, não foi observada a produção de esporos por essas espécies. Dotzauer *et al.* (2002), investigando a causa de perda de vácuo em vários alimentos enlatados, detectaram a presença de *T. saccharolyticum*, *T. thermosulfurigenes* e *Thermoanaerobacterium* sp em produtos de baixa acidez e em purê de tomate.

T. thermosaccharolyticum. Anteriormente chamado de *Clostridium thermosaccharolyticum*, as cepas podem ser móveis ou imóveis, a coloração de Gram é negativa e produzem esporos ovais ou esféricos, terminais, com dilatação do esporângio. Os esporos são extremamente resistentes ao calor, com $D_{121,1^oC}$ = 3 a 4min (Stumbo, 1973). Conhecida há décadas, a deterioração provocada por essa espécie é caracterizada por grande produção de gás, com estufamento das embalagens. Acontece quando o produto permanece por tempo prolongado a temperaturas elevadas, permitindo a germinação de esporos sobreviventes. Pode ser causada por resfriamento lento e/ou estocagem em temperaturas superiores a 43°C (vending machines), porque são termófilos estritos, com temperatura mínima de 37ºC, máxima de 62ºC e ótima entre 55 e 60ºC. Não é uma espécie reconhecida como deteriorante de enlatados ácidos, pois o pH de crescimento tem sido relatado entre 4,7 e 8,5, com ótimo entre 6,2 e 7,2. Ashton & Bernard (2001), entretanto, destacam que já foi incriminado na deterioração de produtos de tomate com pH entre 4,1 e 4,5.

Paenibacillus Ash *et al.* 1994 emend. Shida *et al.* 1997, gen. nov.

Esse gênero foi criado para reclassificar espécies de *Bacillus* mesófilas e caracteristicamente capazes de hidrolizar carboidratos complexos (amido, pectina, carboximetilcelulose, quitina e outros). Inclui também uma espécie anaeróbia anteriormente classificada no gênero *Clostridium* (*P. durum*). A proposta de criação do gênero foi feita por Ash *et al.* (1993), mas o nome só foi validado em 1994 e a descrição foi emendada por Shida *et al.* (1997).

São bastonetes Gram positivos, negativos ou variáveis, catalase positivos ou negativos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos. Crescem entre 0-5 e 50-55°C, com temperatura ótima entre 10 e 40°C. O pH de crescimento varia entre 4,5 e 12,0, com ótimo entre 6,5 e 7,7. As espécies reconhecidas como deteriorantes ou contaminantes de alimentos são *P. polymyxa*, *P. macerans* e *P. lactis*.

P. macerans. Anteriormente chamado *Bacillus macerans*, apresenta morfologia de bastonetes, Gram positivos, produzindo esporos ovais, terminais ou subterminais, com dilatação do esporângio. Mesófilo, cresce entre 10 e 50°C, com temperatura ótima em 30°C e pH ótimo em 7,0. É catalase positivo, embora Stevenson & Segner (2001) relatem que cepas catalase negativas culturalmente semelhantes à *P. macerans* já foram isoladas de cebolas em conserva acidificada (acidificação insuficiente) e creme de milho enlatado subprocessado. Anaeróbio facultativo, produz ácido e gás a partir de carboidratos, deteriorando enlatados de baixa acidez, com perda de vácuo ou estufamento. Dados levantados por Kalogridou-Vassiliadou (1992) também destacaram seu envolvimento na deterioração de leite evaporado, sem produção de gás (tipo “flat sour”). A deterioração geralmente é decorrente de subprocessamento, porque os esporos não são tão resistentes quanto os dos clostrídios putrefativos.

P. polymyxa. Anteriormente chamado *Bacillus polymyxa*, apresenta morfologia de bastonetes, Gram positivos, produzindo esporos ovais, centrais a subterminais, com dilatação do esporângio. Cresce entre cinco e 40°C, com temperatura ótima em 30°C e pH ótimo em 7,0. É catalase positivo, anaeróbio facultativo e produz ácido e gás a partir de carboidratos. Deteriora enlatados de baixa acidez, com perda de vácuo ou estufamento. A deterioração geralmente é decorrente de subprocessamento, porque os esporos não são tão resistentes quanto os dos clostrídios putrefativos.

P. lactis. É uma espécie nova, descrita por Scheldeman *et al.* (2004). A morfologia é de bastonetes, Gram negativos ou variáveis, móveis. Forma esporos ovais ou cilíndricos, subterminais ou paracentrais, com leve dilatação do esporângio. Aeróbios estritos, produzem ácido mas não gás a partir de carboidratos. A temperatura ótima de crescimento é de 30 a 40°C e a máxima de 50 a 55°C. A faixa de pH de crescimento é de 5,6 a 11,0, com ótimo em 7,0. Dados levantados por Scheldeman *et al.* (2006) destacam sua presença em leite cru e equipamentos de fazendas de produção leiteira, bem como o envolvimento na contaminação de leite esterilizado pelo processo UHT ou convencional.

Aneurinibacillus Shida *et al.* 1996, gen. nov.

Esse gênero foi proposto por Shida *et al.* (1996), para reclassificar as cepas anteriormente classificadas como *Bacillus aneurinolyticus* e *Bacillus migulanus*, que caracteristicamente, decompõem a tiamina. São bastonetes móveis, com coloração de Gram positiva ou variável, catalase positivos, negativos ou fracamente positivos. Produzem esporos elipsoidais ou ovais, centrais, paracentrais ou subterminais, podendo dilatar ou não o esporângio. Crescem entre 20 e 65ºC, com ótimo entre 35 e 55ºC. O pH de crescimento encontra-se na faixa de 3,5 a 9,0, com ótimo entre 5,0 e 7,0. Aeróbios estritos, a produção de ácido a partir de carboidratos é variável, sem gás.

Levantamento relatado por Scheldeman *et al.* (2006) revelou a presença de espécies desse gênero em leite cru, equipamentos e ambiente de fazendas de produção leiteira.

Brevibacillus Shida *et al.* 1996, gen. nov.

Esse gênero foi proposto por Shida *et al.* (1996), para reclassificar as cepas anteriormente classificadas como *Bacillus brevis*, que foram divididas em nove espécies. São bastonetes com coloração de Gram positiva, varável ou negativa, móveis, catalase positivos ou fracamente positivos. Produzem esporos elipsoidais ou ovais, com dilatação do esporângio. Mesófilos, crescem entre 10 e 55°C, com temperatura ótima entre 28 e 45°C. O pH de crescimento varia entre 5,5 e 8,5, com ótimo entre 5,0 e 7,5. Aeróbios estritos ou facultativos, produzem ácido mas não gás a partir de carboidratos.

Dados levantados por Scheldeman *et al.* (2006) destacam a presença de *B. brevis*, *B. agri*, *B. borstelensis* e outros brevibacilos em leite cru, equipamentos e ambiente de fazendas de produção leiteira. Destacam também o envolvimento de *B. brevis* e/ou *B. borstelensis* na contaminação de leite esterilizado pelo processo UHT ou convencional. Embora sejam espécies mesófilas, há cepas de *B. brevis* e *B. borstelensis* que podem crescer a 55°C.

Virgibacillus Heyndrickx *et al.* 1998, gen. nov.

Esse gênero foi proposto por Heyndrickx *et al.* (1998), para reclassificar cepas anteriormente classificadas como *Bacillus pantothenticus*, dependentes de ácido pantotênico, tiamina e biotina para crescimento. São bastonetes com coloração de Gram positiva ou variável, móveis, catalase positivos. Produzem esporos elipsoidais ou esféricos, terminais, subterminais ou centrais, com dilatação do esporângio. Mesófilos, crescem entre 5 e 50°C, com ótimo entre 28 e 37°C. Não crescem em pH 5,7 ou abaixo. Halofílicos, a presença de 10% de NaCl estimula o crescimento. Aeróbios ou aneróbios facultativos, produzem ácido sem gás a partir de carboidratos.

De maneira geral, não são contaminantes normais de alimentos, mas levantamento feito por Scheldeman *et al.* (2005) detectou a presença de espécies desse gênero em leite cru, equipamentos e ambiente de fazendas de produção leiteira.

Geobacillus Nazina *et al.* 2001, gen. nov.

Esse gênero foi proposto por Nazina *et al.* (2001), para reclassificar as espécies de *Bacillus* caracteristicamente termófilas.

As células vegetativas são bastonetes com parede celular Gram positiva, mas a coloração de Gram varia entre positiva e negativa. Podem ser móveis ou imóveis e formam esporos elipsoidais ou cilíndricos, terminais ou subterminais, podendo dilatar ou não o esporângio. São termófilos, crescendo entre 30 e 80ºC, com temperatura ótima na faixa de 55 a 65ºC. O pH de crescimento varia entre 5,5 e 8,5, com ótimo entre 6,2 e 7,5. Não exigem vitaminas nem fatores de crescimento e produzem ácido mas não gás a partir de carboidratos. Podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos, a maioria com teste de catalase positivo.

A espécie de maior importância em alimentos comercialmente estéreis é *G. stearothermophilus*. *G. pallidus* é um contaminante frequente de leite cru.

G. stearothermophilus. Anteriormente chamado de *Bacillus stearothermophilus*, é um "flat sour" típico, assim como *B. coagulans*. Ao contrário de *B. coagulans*, entretanto, é termófilo estrito, com temperatura ótima entre 60 e 65ºC, máxima de 70ºC e mínima de 37ºC. Também não é acidúrico e, segundo Sneath *et al.* (1986), 90% ou mais cepas são incapazes de crescer em pH 5,7. White *et al.* (1993), entretanto, encontraram 88% das cepas capazes de crescer em pH 5,5. Algumas cepas são aeróbias estritas e outras anaeróbias facultativas. Nazina *et al.* (2001) relatam entre 11 e 89% das cepas anaeróbias facultativas, enquanto White *et al.* (1993) encontraram 99% das cepas anaeróbias facultativas. Sneath *et al.* (1986) relatam que o teste de catalase, oxidase e citrato podem ser negativos ou positivos, mas White *et al.* (1993) encontraram 99% das cepas negativas para essas três características. A maioria hidroliza a gelatina e a caseína (proteolíticos) e, também, o amido. As células são móveis e produzem esporos com dilatação do esporângio. Os esporos são extremamente resistentes ao calor, com valor $D_{121,1ºC}$ entre 4 e 5min (Stumbo, 1973). A sobrevivência, em pequenos números, é considerada normal nos alimentos de baixa acidez comercialmente estéreis, porque multiplicação só ocorre se o produto for mantido em temperaturas acima de 37ºC. Entretanto, já foi implicado na deterioração de creme de milho, ervilhas enlatadas, leite e outros produtos de baixa acidez. Geralmente a causa é o resfriamento lento e/ou a estocagem dos produtos em temperaturas altas.

G. pallidus é uma espécie nova, descrita em 1987 como *Bacillus pallidus* e, posteriormente, transferida para o gênero *Geobacillus* (Banat *et al.*, 2004). Segundo Banat *et al.*, (2004) e White *et al.* (1993), são bastonetes móveis, anaeróbios facultativos, catalase positivos e crescem entre 30 e 70ºC. Não são acidúricos, crescendo em pH 6,0 mas não a 5,5. A maioria não hidroliza gelatina e caseína (não proteolíticos) nem amido. Não há relatos de seu envolvimento na deterioração de alimentos, mas Scheldeman *et al.* (2006) destacam essa espécie como uma das bactérias esporogênicas mais freqüentes em leite cru e equipamentos de fazendas leiteiras. No levantamento relatado por esses autores, só foi isolado na incubação a 55ºC, não sendo detectada a 37ºC.

22.2. MÉTODOS DE CONTAGEM DE ESPOROS DE TERMÓFILOS AERÓBIOS TOTAIS E "FLAT-SOUR"

Metodologia da American Public Health Association (APHA) para a análise de alimentos, descrita nos Capítulos 24 e 25 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Evancho & Walls, 2001, Olson & Sorrells, 2001).

No Capítulo 25 o *Compendium* trata da contagem de esporos de termófilos "flat sour" em geral. O objetivo é a quantificação de *G. stearothermophilus* e *B. coagulans*, "flat-sour" típicos que

produzem ácido suficiente para provocar viragem ácida no Ágar Dextrose Triptona (DTA), incubado entre 50 e 55°C/48-72h. Outras espécies termófilas também podem crescer e as que produzem quantidades menores de ácido não apresentam o halo amarelo (que também pode ser perdido por reversão alcalina). Os termófilos aeróbios totais são a soma de todas essas cepas, que produzem colônias com e sem viragem ácida.

No Capítulo 24 o *Compendium* trata mais especificamente dos termófilos "flat sour" acidúricos, sendo *B. coagulans* e *A. acidoterrestris* as espécies típicas desse grupo. Os métodos para *Alicyclobacillus* são diferenciados mas, para a contagem de *B. coagulans*, são basicamente os mesmos do Capítulo 25, com pequenas variações.

22.2.1. Material requerido para a análise

- Água destilada estéril
- Solução 0,02N de NaOH estéril (para análise de leite em pó)
- Ágar Dextrose Triptona (DTA)
- Ágar Selo (ágar 2% para sobrecamada na análise de amido)
- Ágar Thermoacidurans (TAA) (opcional para a contagem separada de *B. coagulans*)
- Mistura aquosa de goma tragacanto 2% e goma arábica 1% estéril (para a análise de creme de leite)
- Erlenmeyer de 250ml estéril
- Tubos de 25x150mm estéreis (para a análise de tomates, polpa ou purê de tomate e leite concentrado)
- Placas de Petri estéreis vazias
- Banho-maria à temperatura de ebulição ou banho de óleo a 110°C
- Banho-maria à temperatura de 90ºC (para a análise de tomates, polpa ou purê de tomate e leite concentrado)
- Autoclave operando a 108,4ºC (5 libras de pressão)
- Estufa incubadora regulada entre 50 e 55ºC
- Estufa incubadora regulada a 55±1ºC
- Termômetro calibrado

22.2.2. Procedimento para a análise de açúcar

Descrito no Capítulo 25 do *Compendium* (Olson & Sorrells, 2001), é o procedimento padrão da Association of Official Analytical Chemists (AOAC Official Method 972.45), recomendado pela National Food Processors Association (NFPA) norte-americana (anteriormente chamada de National Canners Association) para o controle da contaminação de enlatados por esporos de bactérias termófilas. No padrão da NFPA para termófilos "flat sour", amostras de lotes de açúcar para enlatados não devem apresentar mais do que 75 esporos, no total de cinco unidades de amostra e média de não mais que 50 esporos/10g. Para esporos de termófilos totais, não devem apresentar mais do que 150 esporos no total das cinco unidades de amostra e média de não mais que 125 esporos/10g. Essas recomendações podem ser usadas como guia para outros ingredientes, levando em conta a proporção do ingrediente no produto final, em comparação com o açúcar.

Choque térmico. Pesar 20g da amostra (ou o peso equivalente a 20g, no caso de açúcar líquido) em um Erlenmeyer de 250ml com marcação no volume de 100ml. Adicionar água destilada estéril até a marca de 100ml, dissolver o açúcar por agitação, aquecer a solução até a fervura e manter sob fervura por cinco minutos. Resfriar imediatamente e repor o volume evaporado com água destilada estéril.

Nota) Cálculo do peso equivalente (PE) a 20g para açúcar líquido: Considerar a graduação Brix como a percentagem (peso/peso) de açúcar na solução, calculando o valor equivalente por regra de três simples. Exemplo: açúcar líquido com 50ºBrix.

100g de solução....................	50g de açúcar
Peso equivalente (PE)..........	20g de açúcar
PE = 100 x 20/50 = 40g	

Inoculação e incubação. Após o choque térmico, distribuir 10ml da solução em cinco placas de Petri estéreis (2ml/placa) e verter aproximadamente 20ml de Ágar Dextrose Triptona (DTA) sobre o inóculo, misturando bem. Aguardar a solidificação do ágar e incubar as placas invertidas, à temperatura de 50 a 55ºC por 48 a 72h.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Para a enumeração dos esporos de termófilos aeróbios totais, contar as colônias presentes em todas as placas, multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos/10g de amostra. Para a enumeração dos esporos dos termófilos "flat-sour", contar apenas as colônias com halo amarelo, características dos "flat-sour", multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos de termófilos "flat-sour"/10g de amostra. Para obter o número de esporos/g, dividir o número de colônias por dois.

22.2.3. Procedimento para a análise de amido

Descrito no Capítulo 25 do *Compendium* (Olson & Sorrells, 2001), é o procedimento recomendado pela National Food Processors Association (NFPA) norte-americana, para o controle da contaminação de enlatados por esporos de bactérias termófilas. No padrão da NFPA para termófilos "flat sour", amostras de lotes de amido para enlatados não devem apresentar mais do que 75 esporos, no total de cinco unidades de amostra e média de não mais que 50 esporos/10g. Para esporos de termófilos totais, não devem apresentar mais do que 150 esporos no total das cinco unidades de amostra e média de não mais que 125 esporos/10g.

Choque térmico. Pesar 20g da amostra em um Erlenmeyer de 250ml seco, com marcação no volume de 100ml. Adicionar água destilada estéril até a marca de 100ml e suspender o amido. Sob constante agitação, pipetar 10ml da suspensão e transferir para um Erlenmeyer com 100ml de Ágar Dextrose Triptona (DTA) estéril, fundido e resfriado a 55-60ºC. Transferir o frasco para um banho fervente e garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir o frasco até a altura da superfície do meio. Manter no banho por três minutos, sob constante agitação, para gelatinizar o amido. Aplicar então o choque térmico em autoclave, 108,4ºC/10min (procedimento padrão da NFPA), ou mantendo no próprio banho, sob fervura, até completar 30min.

Inoculação e incubação. Após o choque térmico, resfriar a amostra, agitando delicadamente, para evitar a incorporação de bolhas. Distribuir os 100ml de DTA em cinco placas de Petri estéreis (aproximadamente 20ml/placa). Aguardar a solidificação do meio, cobrir a superfície com uma sobrecamada de ágar 2% estéril, para prevenir espalhamento. Incubar as placas invertidas a 50-55ºC/48-72h.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Para a enumeração dos esporos de termófilos aeróbios totais, contar as colônias presentes em todas as placas, multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos/10g de amostra. Para a enumeração dos esporos dos termófilos "flat-sour", contar apenas as colônias com halo amarelo, características dos "flat-sour", multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos de termófilos "flat-sour"/10g de amostra. Para obter o número de esporos/g, dividir o número de colônias por dois.

22.2.4. Procedimento para a análise de tomates inteiros, polpa de tomate, purê de tomate e leite concentrado

Descrito no Capítulo 24 do *Compendium* (Evancho & Walls, 2001).

Choque térmico. Transferir duas porções de 10ml da amostra para dois tubos estéreis de 25x150mm. Os tomates inteiros devem ser homogeneizados em liquidificador, sem adição de diluente, para a retirada da unidade analítica de 10ml. Colocar os tubos em um banho a 90ºC, garantindo que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os tubos até a altura da superfície da amostra. Controlar a temperatura de subida do produto com um termômetro introduzido em um dos tubos (controle). A partir do instante em que o produto atingir a temperatura do banho, contar cinco minutos e resfriar imediatamente em banho de gelo, descartando o tubo controle. Na análise de produtos recém-processados, submetidos à temperatura de 82ºC ou maior, o choque térmico pode ser dispensado.

Inoculação e incubação. Após o choque térmico, transferir quatro porções de 1ml da amostra (e diluições decimais, se necessárias) para quatro placas de Petri estéreis vazias. Para a contagem de esporos de termófilos aeróbios totais e "flat sour", verter sobre duas placas, 15-20ml de Ágar Dextrose Triptona (DTA). Para contar apenas *B. coagulans*, verter sobre as outras duas placas, 15-20ml de Ágar Thermoacidurans (TAA). Homogeneizar bem, aguardar a completa solidificação do meio e incubar as placas invertidas a 55±1ºC/48±3h.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Para a determinação do número de esporos de termófilos aeróbios totais/ml de amostra, contar todas as colônias das duas placas de DTA, multiplicar pelo inverso da diluição (se foi feita diluição), tirar a média e apresentar o resultado como o número de esporos/ml de amostra. Para a enumeração dos esporos dos termófilos "flat-sour", contar apenas as colônias com halo amarelo nas placas de DTA, multiplicar pelo inverso da diluição (se foi feita diluição), tirar a média e apresentar o resultado como o número de esporos/ml de amostra. Para a determinação do número de esporos de *B. coagulans*/ml de amostra, contar todas as colônias das duas placas de TAA, multiplicar pelo inverso da diluição (se foi feita diluição), tirar a média e apresentar o resultado como o número de esporos/ml de amostra.

22.2.5. Procedimento para a análise de leite em pó desnatado

Descrito no Capítulo 24 do *Compendium* (Evancho & Walls, 2001).

Choque térmico. Pesar 10g da amostra em um Erlenmeyer de 250ml, com marcação no volume de 100ml. Dissolver o leite em uma solução estéril de NaOH 0,02N, adicionada até a marca de 100ml. Autoclavar por 10min a cinco libras de pressão (108,4ºC), resfriar imediatamente e repor o volume evaporado com NaOH 0,02N estéril.

Inoculação e incubação. Distribuir 20ml da amostra em 10 placas de Petri estéreis (2ml/placa) e verter 15 a 20ml de DTA sobre o inóculo, misturando bem. Aguardar a completa solidificação do meio e incubar as placas invertidas a 55±1ºC/48±3h.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Para a enumeração dos esporos de termófilos aeróbios totais, contar as colônias presentes em todas as placas, multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos/10g de amostra. Para a enumeração dos esporos dos termófilos "flat-sour", contar apenas as colônias com halo amarelo, características dos "flat-sour", multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos de termófilos "flat-sour"/10g de amostra. Para obter o número de esporos/g, dividir o número de colônias por dois.

22.2.6. Procedimento para a análise de creme de leite

Descrito no Capítulo 24 do *Compendium* (Evancho & Walls, 2001).

Choque térmico. Misturar 2g de goma tragacanto e 1g de goma arábica em 100ml de água destilada e esterilizar a 121ºC/20min. Transferir 20ml da amostra de creme de leite para um Erlenmeyer de 250ml, com marcação no volume de 100ml. Misturar o creme com a mistura de gomas, adicionada até a marca de 100ml. Autoclavar por 5min a cinco libras de pressão (108,4ºC).

Inoculação e incubação. Sem esfriar a amostra, distribuir imediatamente 10ml em cinco placas de Petri (2ml/placa), adicionando o meio de cultura (15-20ml de DTA) antes da amostra, devido à viscosidade do material. Misturar o inóculo com o meio da maneira usual. Aguardar a completa solidificação do meio e incubar as placas invertidas a 55±1ºC/48±3h.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Para a enumeração dos esporos de termófilos aeróbios totais, contar as colônias presentes em todas as placas, multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos/10ml de amostra. Para a enumeração dos esporos dos termófilos "flat-sour", contar apenas as colônias com halo amarelo, características dos "flat-sour", multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos de termófilos "flat-sour"/10ml de amostra. Para obter o número de esporos/ml, dividir o número de colônias por dois.

22.2.7 Procedimento para a análise de outros alimentos (geral)

O esquema geral de análise para contagem de esporos de termófilos aeróbios totais e "flat sour" em alimentos encontra-se descrito na Figura 22.1. O Capítulo 25 do *Compendium* (Olson & Sorrells, 2001) recomenda os mesmos métodos utilizados para açúcar ou amido, com as modificações adequadas às características físicas ou químicas da amostra. O procedimento descrito abaixo é similar ao descrito para amido e aplica-se a uma gama bastante variada de produtos.

Inoculação e choque térmico. Pesar 20g da amostra em um frasco com marcação no volume de 100ml. Adicionar água destilada estéril até a marca de 100ml e homogeneizar. Transferir 10ml da amostra homogeneizada para um Erlenmeyer de 300ml com 100ml de Ágar Dextrose Triptona (DTA) estéril, fundido e resfriado a 55-60ºC. Misturar a amostra com o meio de cultura, transferir o Erlenmeyer para um banho fervente e manter no banho por 30min. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir o Erlenmeyer até a altura da superfície do meio. O choque térmico também pode ser feito a 110ºC/10min (banho de óleo ou autoclave).

> **Nota)** O choque térmico especificado no Capítulo 25 do *Compendium* (Olson & Sorrells, 2001), para aplicação geral, é de 30min a 100ºC ou 10min a 110ºC. Não é citada a necessidade de controle da subida da temperatura, pressupondo-se que a contagem do tempo seja iniciada a partir do momento em que os Erlenmeyers sejam colocados no banho ou autoclave. É importante que o choque térmico seja feito em Erlenmeyer de 300ml, porque o procedimento, sem acompanhar o tempo de subida, é padronizado para esse tipo de frasco.

Incubação. Após o choque térmico, resfriar a amostra, agitando delicadamente, para evitar a incorporação de bolhas. Distribuir os 100ml de DTA em cinco placas de Petri estéreis (aproximadamente 20ml/placa), aguardar a completa solidificação do ágar e incubar as placas, invertidas, a 50-55ºC/48-72h.

> **Nota)** O Capítulo 25 do *Compendium* (Olson & Sorrells, 2001) não estabelece a variação máxima de temperatura e tempo recomendável na incubação. No Capítulo 24 (Evancho & Walls, 2001), mais específico para "flat sour" acidúricos, estabelece a temperatura de 55ºC, com variação máxima de ±1ºC.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Para a enumeração dos esporos de termófilos aeróbios totais, contar as colônias presentes em todas as placas, multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos/10g de amostra. Para a enumeração dos esporos dos termófilos "flat-sour", contar apenas as colônias com halo amarelo, características dos "flat-sour", multiplicar por cinco e apresentar o resultado como o número de esporos de termófilos "flat-sour"/10g de amostra. Para obter o número de esporos/g, dividir o número de colônias por dois.

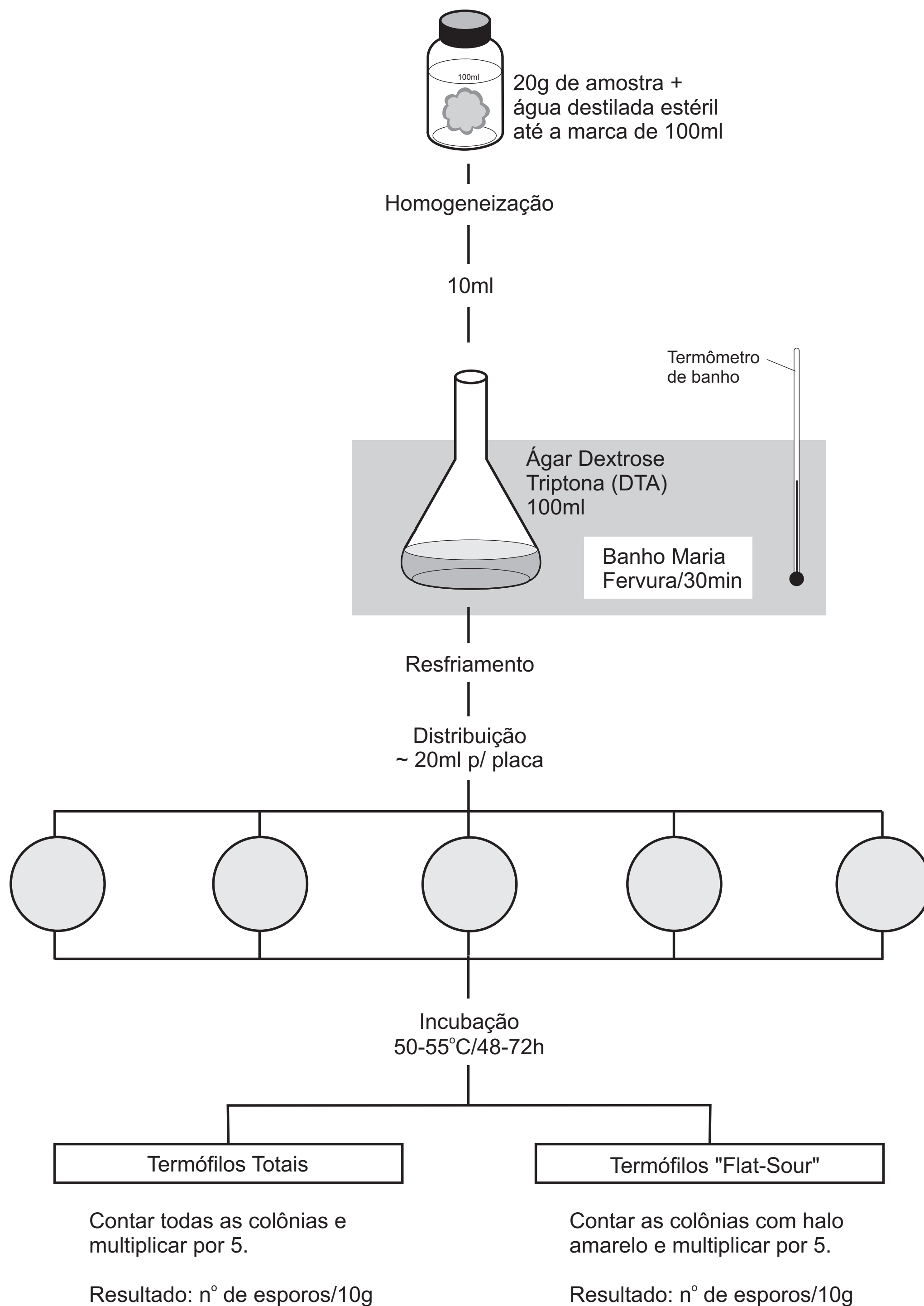


Figura 22.1. Esquema de análise para contagem de esporos de termófilos aeróbios totais e "flat sour" em alimentos.

22.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ESPOROS DE TERMÓFILOS ANAERÓBIOS NÃO-PRODUTORES DE H_2S (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)

Metodologia da American Public Health Association (APHA) para a análise de alimentos, descrito no Capítulo 26 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Ashton & Bernard, 2001).

Esses métodos objetivam a detecção de *T. thermosaccharolyticum*, espécie típica de bactéria esporogênica anaeróbia sacarolítica, produtora de gás e não produtoras de H_2S. Os ensaios não são quantitativos, mas sim, técnicas que detectam a presença dos esporos em uma dada quantidade de produto, sem uma exata quantificação. Sua principal aplicação é o controle da matéria-prima, para limitar a introdução dos esporos na formulação de enlatados, embora também possa ser aplicada na análise dos produtos processados ou na linha de processamento. Amostras de lotes de matéria-prima para enlatados não devem apresentar esporos em mais do que 60% das unidades de amostra analisadas ou em mais do que 66% dos tubos de meio de cultura inoculados por unidade de amostra.

Alimentos enlatados com suspeita de deterioração por termófilos anaeróbios não devem ser refrigerados porque as células vegetativas dessas bactérias morrem sob refrgeração e não é comum a produção de esporos nos produtos.

22.3.1. Material requerido para a análise

- Água destilada estéril
- Tubos de Meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF)
- Ágar Selo (Ágar 2%) ou Vaspar (Vaselina:Parafina 1:1)
- Frasco ou Erlenmeyer estéril e seco (com pérolas de vidro no caso de amostras de amido e farinhas)
- Banho-maria à temperatura de ebulição
- Estufa incubadora regulada a 55±2ºC
- Termômetro calibrado

22.3.2. Procedimento para a análise de açúcar e leite em pó

Choque térmico. Pesar 20g da amostra (ou o peso equivalente a 20g, no caso de açúcar líquido) em um frasco ou Erlenmeyer com marcação no volume de 100ml. Adicionar água destilada estéril até a marca de 100ml, dissolver a amostra por agitação, aquecer a solução até a fervura e manter sob fervura por cinco minutos. Resfriar imediatamente e repor o volume evaporado com água destilada estéril. Para o cálculo do peso equivalente a 20g para açúcar líquido, seguir as orientações do item 22.2.2.

Inoculação e incubação. Após o choque térmico, distribuir 20ml da amostra diluída (equivalente a 4g da amostra original) em seis tubos de Meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF) previamente desaerados (aproximadamente 3,3ml/tubo). Recobrir a superfície do meio com uma camada de 15mm de ágar selo (ágar 2%) ou vaspar. Aguardar a solidificação do ágar e incubar os tubos a 55±2ºC/72h. Observação: Usar tubos com tampão de algodão ou tubos de rosca com as tampas afrouxadas na incubação, para permitir o escape do excesso de gás.

> **Nota)** Para o sucesso das análises, é importante garantir a ausência de resíduos de pesticidas nas ervilhas utilizadas na formulação do Meio PE-2. Além disso, antes da esterilização, as ervilhas devem permaner uma hora de molho no caldo de cultura, para

garantir a eficiência da esterilização. Os lotes de PE-2 preparados devem ser testados com uma cepa padrão de *T. thermosaccharolyticum*, para verificar se não há inibição e prevenir falsos resultados negativos. Tubos não utilizados podem ser submetidos a novo processo de esterilização, sem prejuízo das análises. O método padrão da AOAC para açúcar (AOAC Official Method 972.45) recomenda o Caldo de Fígado em lugar do PE-2. Entretanto, o *Compendium* recomenda que seja utilizado o meio comercial, porque, na formulação preparada em laboratório, o fígado bovino pode conter inibidores, incluindo antibióticos. Tanto o PE-2 como o CF devem ser desaerados antes do uso, por fervura em banho/15min, com as tampas desrosqueadas, e resfriamento imediato em banho de gelo.

Leitura e interpretação dos resultados. A observação de crescimento em um ou mais tubos de cultura, com abundante produção de gás, deslocando o selo de ágar para cima, indica a presença de esporos de anaeróbios termófilos não-produtores de H_2S, na quantidade de amostra inoculada. Termófilos tipo “flat-sour” também podem crescer nessas condições, mas não produzem gás e, no PE-2, podem ser diferenciados pela alteração da cor do meio (viragem de púrpura para amarelo).

22.3.3. Procedimento para a análise de amido e farinhas

Inoculação e choque térmico. Pesar 20g da amostra em um frasco seco, com marcação no volume de 100ml, contendo algumas pérolas de vidro. Adicionar água destilada estéril até a marca de 100ml, agitando até obter uma suspensão homogênea. Sob constante agitação, distribuir 20ml da suspensão (4g da amostra) em seis tubos de meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF) previamente desaerados e submeter à fervura em banho por 15min. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície do meio. Durante os primeiros cinco minutos de fervura, até a gelatinização da amostra, agitar constante e delicadamente os tubos por inversão, de forma a dispersar amostra, porém, sem introduzir ar no meio de cultura.

Incubação e leitura dos resultados. Após o choque térmico, resfriar os tubos em banho de gelo e cobrir a superfície do meio de cultura com uma camada de 15mm de ágar selo ou vaspar. Incubar a 55±2ºC/72h, interpretando os resultados da mesma forma descrita para açúcar e leite em pó (item 22.3.2).

22.3.4. Procedimento para a análise de cereais e massas alimentícias

Pesar 50g da amostra em um frasco de homogeneização e adicionar 200ml de água destilada estéril. Homogeneizar por três minutos em liquidificador e distribuir 20ml da amostra em seis tubos de meio PE-2 ou Caldo de Fígado previamente desaerados. Submeter ao choque térmico e incubação da mesma forma descrita para amido e farinhas (item 22.3.3), porém, interpretar os resultados assumindo que 10ml da amostra homogeneizada contêm 2g da amostra original.

22.3.5. Procedimento para a análise de cogumelos frescos

Homogeneizar 200g da amostra em um liquidificador estéril, sem adição de diluente, interrompendo o processo e agitando o jarro várias vezes, para uma boa homogeneização. Transferir 20g da amostra homogeneizada para um frasco com marcação no volume de 100ml e seguir o mesmo procedimento descrito para açúcar e leite em pó (item 22.3.2).

22.3.6. Procedimento para a análise de produtos na linha de processamento

Transferir 100g da amostra para um frasco de homogeneização e homogeneizar por três minutos em liquidificador, sem adição de diluente. Distribuir 20g ou 20ml da amostra homogeneizada em seis tubos de meio PE-2 ou Caldo de Fígado previamente desaerados e continuar a análise da mesma forma descrita para amido e farinhas (item 22.3.3).

22.4. MÉTODOS DE CONTAGEM DE ESPOROS DE TERMÓFILOS ANAERÓBIOS PRODUTORES DE H_2S (*Desulfotomaculum nigrificans*)

Metodologia da American Public Health Association (APHA) para a análise de alimentos, descrito no Capítulo 27 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Donnelly & Hannah, 2001). O procedimento para a análise de açúcar é o padrão da Association of Official Analytical Chemists (AOAC Official Method 972.45).

Esses métodos objetivam a detecção de *Desulfotomaculum nigrificans*, espécie típica de bactéria esporogênica anaeróbia sacarolítica produtora de H_2S.

22.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Água destilada estéril
- Água peptonada 0,1% (para análise de isolados protéicos de soja)
- Tubos de Ágar Sulfito
- Solução 0,02N de NaOH estéril (para análise de leite em pó)
- Vaspar ou Ágar Selo (Ágar 2%)
- Erlenmeyer de 250ml estéril e seco (com pérolas de vidro no caso de amostras de amido e farinhas)
- Banho-maria à temperatura de ebulição
- Autoclave operando a 108,4ºC (5 libras de pressão)
- Estufa incubadora regulada entre 50 e 55ºC
- Estufa incubadora regulada entre 55±1ºC (para a análise de isolados proteicos de soja)
- Termômetro calibrado

22.4.2. Procedimento para a análise de açúcar

AOAC Official Method 972.45, descrito no Capítulo 27 do *Compendium* (Donnelly & Hannah, 2001).

Choque térmico. Pesar 20g da amostra (ou o peso equivalente a 20g, no caso de açúcar líquido) em um Erlenmeyer de 250ml com marcação no volume de 100ml. Adicionar água destilada estéril até a marca de 100ml, dissolver o açúcar por agitação, aquecer a solução até a fervura e manter sob fervura por cinco minutos. Resfriar imediatamente e repor o volume evaporado com água destilada estéril. Para o cálculo do peso equivalente a 20g para açúcar líquido, seguir a orientação do item 22.2.2.

Inoculação e incubação. Após o choque térmico, distribuir 20ml da solução (4g da amostra) em seis tubos de Ágar Sulfito previamente fundidos e desaerados. Depositar o inóculo abaixo da superfície do meio e agitar delicadamente por inversão, para misturar sem introduzir ar. Resfriar rapidamente em banho de gelo e incubar a 50-55ºC/48h. Fazer uma leitura preliminar com 20-24±3 horas de incubação, pois pode haver crescimento de cepas termófilas anaeróbias que não produzem H_2S mas reduzem o sulfato e produzem gás, escurecendo completamente o meio e provocando o rompimento do ágar.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Após o período de incubação, contar as colônias características de *D. nigrificans* em todos os tubos inoculados (colônias pretas, sem formação de gás) e calcular o número de Esporos/10g = 10 x Número total de colônias nos seis tubos/4.

22.4.3. Procedimento para a análise de amido e farinhas

Adaptado a partir do AOAC Official Method 972.45, descrito no Capítulo 27 do *Compendium* (Donnelly & Hannah, 2001).

Pesar 20g da amostra em um Erlenmeyer seco com marcação no volume de 100ml, contendo algumas pérolas de vidro. Adicionar água destilada estéril até a marca de 100ml, agitando até obter uma suspensão homogênea. Sob constante agitação, distribuir 20ml da suspensão (4g da amostra) em seis tubos de Ágar Sulfito previamente fundidos e desaerados. Depositar o inóculo abaixo da superfície do meio e agitar delicadamente por inversão, para misturar sem introduzir ar. Submeter os tubos à fervura em banho por 15min, agitando freqüente e delicadamente por inversão, dispersando a amostra sem introduzir ar no meio de cultura. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os tubos até a altura da superfície do meio. Após o choque térmico, resfriar os tubos em banho de gelo e incubar a 50-55ºC/24-48h. Fazer uma leitura preliminar com 20-24±3 horas de incubação, pois pode haver crescimento de cepas termófilas anaeróbias que não produzem H_2S mas reduzem o sulfato e produzem gás, escurecendo completamente o meio e provocando o rompimento do ágar. Contar as colônias características de *D. nigrificans* em todos os tubos inoculados (colônias pretas, sem formação de gás) e calcular o número de Esporos/10g = 10 x Número total de colônias nos seis tubos/4.

22.4.4. Procedimento para a análise de leite em pó desnatado

Descrito no Capítulo 27 do *Compendium* (Donnelly & Hannah, 2001).

Pesar 10g da amostra em um Erlenmeyer de 250ml, com marcação no volume 100ml. Dissolver o leite em uma solução estéril de NaOH 0,02N, adicionada até a marca de 100ml. Autoclavar por 10 minutos a cinco libras de pressão (108,4ºC) e resfriar imediatamente. Transferir duas porções de 2ml da amostra para dois tubos de Ágar Sulfito previamente fundidos e desaerados. Depositar o inóculo abaixo da superfície do meio e agitar delicadamente por inversão, para misturar sem introduzir ar. Incubar a 50-55ºC/24-48±3h. Fazer uma leitura preliminar com 20-24±3 horas de incubação, pois pode haver crescimento de cepas termófilas anaeróbias que não produzem H_2S mas reduzem o sulfato e produzem gás, escurecendo completamente o meio e provocando o rompimento do ágar. Contar as colônias características de *D. nigrificans* nos dois tubos inoculados (colônias pretas, sem formação de gás) e calcular o número de Esporos/10g = 50 x Número total de colônias nos dois tubos.

22.4.5. Procedimento para a análise de isolados protéicos de soja

Descrito no Capítulo 27 do *Compendium* (Donnelly & Hannah, 2001).

Preparar uma suspensão 10% da amostra em água peptonada 0,1% e ajustar o pH em 7,0. Autoclavar por 20min a cinco libras de pressão (108,4ºC) e resfriar imediatamente. Transferir dez porções de 1ml da amostra para dez tubos de Ágar Sulfito previamente fundidos e desaerados. Depositar o inóculo abaixo da superfície do meio e agitar delicadamente por inversão, para misturar sem introduzir ar. Cobrir a superfície do meio com uma camada de 15mm de ágar selo ou vaspar. Incubar a 55±1ºC por até 14 dias, com leitura em 2, 7 e 14 dias. Contar as colônias características de *D. nigrificans* em todos os tubos inoculados (colônias pretas, sem formação de gás) e calcular o número de Esporos/10g = 10 x Número total de colônias nos 10 tubos.

22.5. MÉTODOS DE CONTAGEM DE ESPOROS DE MESÓFILOS AERÓBIOS

Método da American Public Health Association (APHA) para a análise de alimentos, descrito no Capítulo 22 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Stevenson & Segner, 2001). Incluídas também as recomendações do item 8.090 do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004) específicas para a análise de produtos lácteos, e as da Seção 9218 do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005), para a análise de água.

Esse grupo, tradicionalmente, objetivava a detecção de espécies mesófilas de *Bacillus*. Atualmente essas espécies estão alocadas nos vários novos gêneros derivados do gênero *Bacillus* (*Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*). As mais importantes são *Paenibacillus macerans, Paenibacillus polymyxa* e *Bacillus licheniformis.*

22.5.1. Material requerido para a análise

- Água peptonada 0,1% (H_2Op)
- Ágar Triptona Glicose Extrato de Carne (TGE)
- Ágar Padrão para Contagem (PCA) suplementado com 0,1% de amido solúvel (para a análise de leite e produtos lácteos)
- Ágar Nutriente suplementado com 0,015g/l de azul de tripano (para a análise de água)
- Placas de Petri estéreis
- Banho-maria regulado a 80±1°C com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 35±1°C com termômetro calibrado (±0,5°C para a análise de água)
- Estufa incubadora a 32±1°C com termômetro calibrado (para a análise de leite e produtos lácteos)

22.5.2. Procedimento para alimentos em geral

Descrito no Capítulo 23 do *Compendium* (Stevenson & Segner, 2001).

O esquema de análise para contagem de esporos de mesófilos aeróbios encontra-se descrito na Figura 22.2.

Choque térmico. Pesar 50g da amostra em um frasco de homogeneização e adicionar 450ml de água peptonada 0,1%, homogeneizando a amostra, de acordo com as recomendações do capítulo 2. Transferir porções de dez, um e 0,1ml da amostra homogeneizada para três frascos diferentes, contendo 100ml de Ágar Triptona Glicose Extrato de Carne (TGE) previamente fundido e resfriado a 50-55ºC. Misturar bem o inóculo ao meio de cultura e submeter a um choque térmico de 10min a 80ºC, em banho com temperatura controlada. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície do meio. Iniciar a contagem dos 10min a partir do momento em que os frascos atingirem a temperatura de 80ºC, usando um frasco de TGE não inoculado para acompanhar a subida da temperatura com um termômetro. Periodicamente, agitar levemente os frascos, para auxiliar na distribuição do calor.

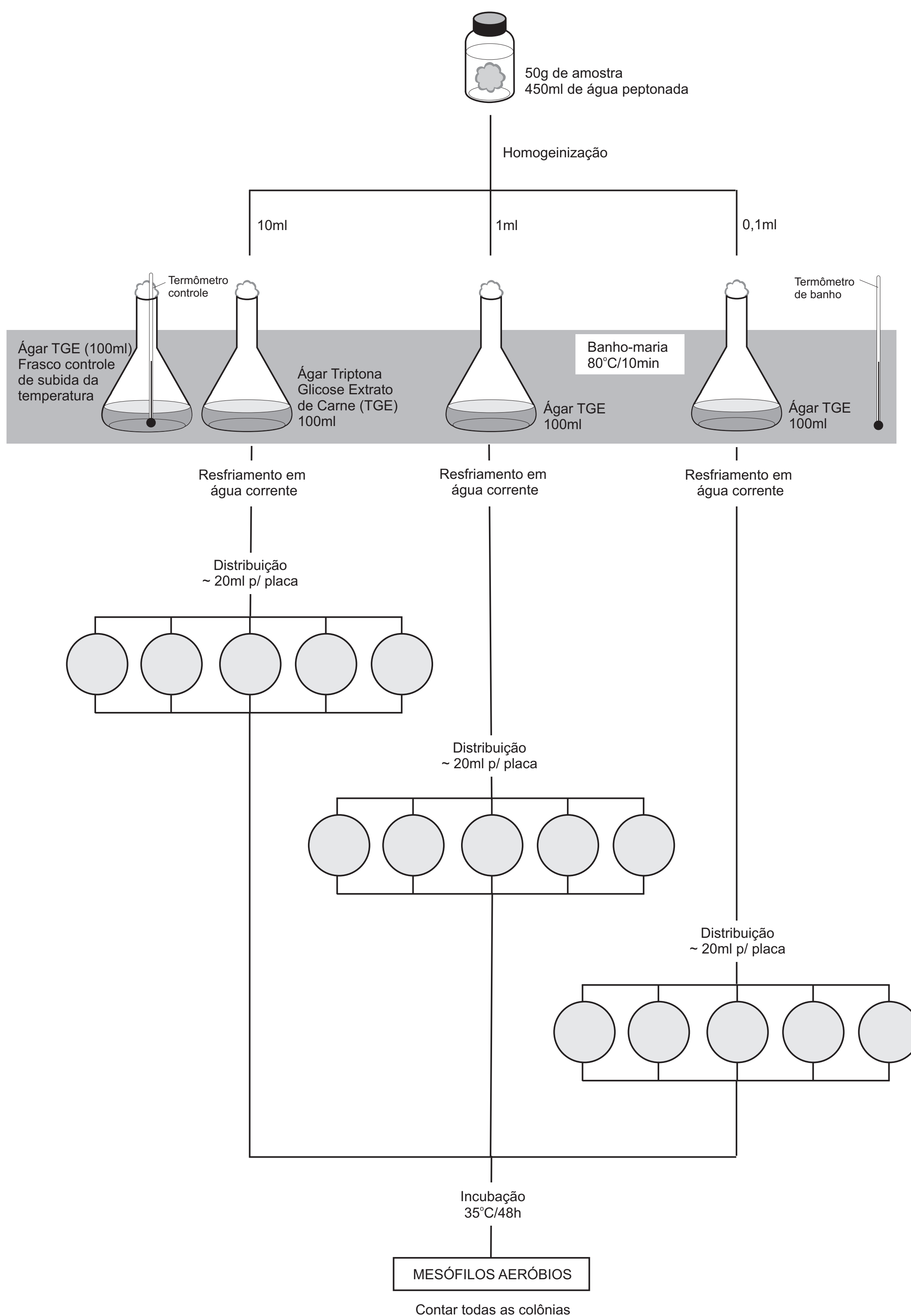


Figura 22.2. Esquema de análise para contagem de esporos de mesófilos aeróbios em alimentos (Stevenson & Segner, 2001).

Nota) Quando o choque térmico é feito em Erlenmeyer de 500ml, o procedimento descrito no *Compendium* é de 30min a 80°C, contados a partir do momento em que os frascos são colocados no banho (não é necessário acompanhar a subida da temperatura para contar o tempo). Quando são usados outros tipos de frascos, o choque térmico é de 10min a 80°C, mas o tempo só é contado depois que o meio atinge a temperatura de 80°C (é necessário acompanhar a subida da temperatura em um frasco não inoculado de TGE, idêntico ao usado para as amostras).

Incubação. Após o tratamento térmico, resfriar o meio de cultura em água corrente e distribuir cada porção de 100ml de TGE em cinco placas de Petri estéreis vazias. Aguardar a completa solidificação do ágar e incubar as placas invertidas a 35ºC/48h.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Contar as colônias desenvolvidas nas cinco placas da diluição apropriada para a contagem (com 25 a 250 colônias) e apresentar o resultado por grama de amostra: Nº esporos/g = soma das colônias no frasco com 10ml da amostra ou 10 vezes soma das colônias no frasco com 1ml da amostra homogeneizada ou 100 vezes soma das colônias no frasco com 0,1ml da amostra homogeneizada. O número de esporos que pode ser quantificado por essa técnica varia na faixa de um a 150.000/g.

22.5.3. Procedimento para análise de leite e produtos lácteos

Descrito no item 8.090 do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004). **Aplicação**: contagem de esporos de aeróbios mesófilos ou psicrotróficos em leite fluído cru ou submetido a tratamento térmico, leite evaporado e outros produtos de leite enlatados, leite em pó e outros produtos em pó derivados de leite.

Choque térmico. Homogeneizar bem a amostra e transferir duas porções de 200ml para dois frascos estéreis (os dois frascos devem ser iguais). Submeter a choque térmico a 80+1ºC/12min, em banho com temperatura controlada. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície da amostra. Iniciar a contagem do tempo de tratamento térmico a partir do momento em que os frascos atingirem a temperatura de 80ºC (usar um dos frascos de amostra para acompanhar a subida da temperatura, com um termômetro). Periodicamente, agitar os frascos, para auxiliar na distribuição do calor. Após o tratamento térmico, resfriar imediatamente a amostra em banho de gelo.

Nota) Embora o procedimento acima seja aplicável a leite em pó e outros produtos em pó derivados de leite, o *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* não descreve a forma de hidratação dessas amostras para o choque térmico. Uma alternativa razoável é fazer a diluição 1:10 (50g em 450ml de água destilada) e calcular o número de esporos por grama de amostra. Outra é diluir na proporção recomendada para o uso ou consumo final do produto, calculando o número de esporos por mililitro de amostra reconstituída.

Inoculação e incubação. Inocular a amostra em Ágar Padrão para Contagem (PCA) suplementado com 0,1% de amido solúvel, utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade ou superfície descrita no Capítulo 3. Incubar as placas a 32±1°C/48h.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Contar as colônias e calcular o Nº esporos/ml, como descrito no Capítulo 3.

22.5.4. Procedimento para a análise de água

Descrito na Seção 9218 do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005).

Choque térmico. Homogeneizar bem a amostra e transferir porções de igual volume para frascos ou Erlenmeyers diferentes estéreis. O volume total de amostra a ser analisada depende da contagem estimada de esporos. Submeter a choque térmico a 75ºC/15min ou 80ºC/10min, em banho com temperatura controlada. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície da amostra. Iniciar a contagem do tempo de tratamento térmico a partir do momento em que os frascos atingirem a temperatura de choque térmico (usar um dos frascos de amostra para acompanhar a subida da temperatura, com um termômetro). Periodicamente, agitar os frascos, para auxiliar na distribuição do calor. Após o tratamento térmico, resfriar imediatamente a amostra em banho de gelo.

Inoculação e incubação. Inocular a amostra em Ágar Nutriente suplementado com 0,015g/l de azul de tripano, utilizando a técnica filtração em membrana descrita no Capítulo 3. Incubar as placas a 35±0,5ºC/24±2h.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Contar as colônias e calcular o Nº esporos/ml, como descrito no Capítulo 3.

22.6. MÉTODO DE CONTAGEM DE ESPOROS DE MESÓFILOS ANAERÓBIOS

Metodologia da American Public Health Association (APHA) para a análise de alimentos, descrito no Capítulo 23 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Scott et al., 2001). Incluídas também as recomendações do item 8.100 do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004) específicas para a análise leite fluído e queijos.

22.6.1. Material requerido para a análise

- Água destilada estéril
- Meio de Carne Cozida (CMM), Meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF)
- Meio Reforçado para Clostrídios (RCM) (para a análise de leite fluído e queijos)
- Meio Reforçado para Clostrídios com Lactato de Sódio (RCML) (opcional para a contagem de *Clostridium tyrobutyricum* em leite fluído e queijos)
- Meio de Carne Cozida (CMM) suplementado com 0,1% de amido solúvel e 0,1% de glicose (para a detecção preferencial de clostrídios não proteolíticos)
- Ágar Dextrose Triptona (DTA) ou Caldo Soro de Laranja (para a detecção preferencial de clostrídios butíricos)
- Ágar Selo ou Vaspar (se usar Caldo de Fígado)
- Ágar Selo Tioglicolato (para a análise de leite fluído e queijos)
- Erlenmeyer de 250ml
- Banho-maria sob fervura
- Banho-maria a 60ºC com termômetro calibrado (para a detecção preferencial de clostrídios não proteolíticos e gupo butírico)
- Banho-maria a 80±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 30-35ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 37±1ºC com termômetro calibrado (para a análise de leite fluído e queijos)

22.6.2. Procedimento para a análise de açúcar

Descrito no Capítulo 23 do *Compendium* (Scott *et al.*, 2001).

Pesar 20g da amostra (ou o peso equivalente a 20g, no caso de açúcar líquido, calculado conforme descrição do item 22.2.2) em um Erlenmeyer de 250ml e adicionar água destilada estéril até completar 100ml. Dissolver o açúcar, aquecer até a fervura e manter sob fervura por 5min. Resfriar imediatamente e distribuir 20ml da solução (4g de amostra) em seis tubos de Meio de Carne Cozida (CMM), Meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF) previamente desaerados (fervura em banho por 15min, com as tampas desrosqueadas e resfriamento imediato em banho de gelo). Incubar os tubos a 30-35ºC/72h e observar. Não havendo crescimento, reincubar até completar sete dias. Relatar o resultado como presença ou ausência de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias na quantidade de amostra inoculada.

> **Nota)** O CMM e o PE-2 não precisam ser cobertos com Ágar Selo ou Vaspar, mas o CF sim. Para o sucesso das análises, é importante garantir a ausência de resíduos de pesticidas nas ervilhas utilizadas na formulação do Meio PE-2. Além disso, antes da esterilização, as ervilhas devem permanecer uma hora de molho no caldo de cultura, para garantir a eficiência da esterilização. No caso do CF, recomenda-se que seja utilizado o meio comercial, porque, na formulação preparada em laboratório, o fígado bovino pode conter inibidores, incluindo antibióticos.

Cuidado! Os meios de cultura permitem o crescimento e a produção de toxina de *Clostridium botulinum*. Após a incubação, o manuseio e o descarte devem ser feitos com o máximo cuidado, para evitar riscos de contaminação do analista e do laboratório. Colocar luvas, trabalhar com o material sobre bandejas, não diretamente sobre as bancadas, desinfetar todas as superfícies com solução de NaOH 1N e esterilizar todo o material de descarte a 121ºC/30min.

22.6.3. Procedimento para a análise de amido, farinhas e outros produtos de cereais

Descrito no Capítulo 23 do *Compendium* (Scott *et al.*, 2001).

Pesar 11g da amostra, adicionar 99ml de água destilada estéril e suspender sob agitação. Sob constante agitação, distribuir 20ml da suspensão (2g de amostra) em seis tubos de Meio de Carne Cozida (CMM), Meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF) previamente desaerados. Transferir os tubos para um banho sob fervura e manter no banho por 20min, garantindo que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os tubos até a altura da superfície do meio. Agitar periodicamente os tubos (por inversão), durante a fervura, sem introduzir ar. Resfriar imediatamente e incubar a 30-35ºC/72h. Reincubar os tubos negativos por até sete dias. Relatar o resultado como presença ou ausência de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias na quantidade de amostra inoculada.

> **Nota)** O CMM e o PE-2 não precisam ser cobertos com Ágar Selo ou Vaspar, mas o CF sim. Para o sucesso das análises, é importante garantir a ausência de resíduos de pesticidas nas ervilhas utilizadas na formulação do Meio PE-2. Além disso, antes da esterilização, as ervilhas devem permanecer uma hora de molho no caldo de cultura, para garantir a eficiência da esterilização. No caso do CF, recomenda-se que seja utilizado o meio comercial, porque, na formulação preparada em laboratório, o fígado bovino pode conter inibidores, incluindo antibióticos.

Cuidado! Os meios de cultura permitem o crescimento e a produção de toxina de *Clostridium botulinum*. Após a incubação, o manuseio e o descarte devem ser feitos com o máximo cuidado, para evitar riscos de contaminação do analista e do laboratório. Colocar luvas, trabalhar com o material sobre bandejas, não diretamente sobre as bancadas, desinfetar todas as superfícies com solução de NaOH 1N e esterilizar todo o material de descarte a 121ºC/30min.

22.6.4. Procedimento para a análise de vegetais desidratados

Descrito no Capítulo 23 do *Compendium* (Scott *et al.*, 2001).

Pesar 10g da amostra em um Erlenmeyer de 250ml, adicionar 190ml de água destilada estéril e manter em repouso por 30min, sob refrigeração (4-5°C), para reidratação. Após o repouso, agitar por 2-3min (lavagem superficial), transferir para um banho sob fervura e manter no banho por 20-30min, agitando constantemente durante a fervura. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície da amostra. Opcionalmente, o choque térmico pode ser feito em autoclave, a 108°C/10min. Resfriar imediatamente, distribuir 20ml do líquido (1g de amostra lavada) em tubos de Meio de Carne Cozida (CMM), Meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF) previamente desaerados e incubar a 30-35ºC/72h. Reincubar os tubos negativos por até sete dias. Relatar o resultado como presença ou ausência de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias na quantidade de amostra inoculada.

> **Nota)** O CMM e o PE-2 não precisam ser cobertos com Ágar Selo ou Vaspar, mas o CF sim. Para o sucesso das análises, é importante garantir a ausência de resíduos de pesticidas nas ervilhas utilizadas na formulação do Meio PE-2. Além disso, antes da esterilização, as ervilhas devem permanecer uma hora de molho no caldo de cultura, para garantir a eficiência da esterilização. No caso do CF, recomenda-se que seja utilizado o meio comercial, porque, na formulação preparada em laboratório, o fígado bovino pode conter inibidores, incluindo antibióticos.

Cuidado! Os meios de cultura permitem o crescimento e a produção de toxina de *Clostridium botulinum*. Após a incubação, o manuseio e o descarte devem ser feitos com o máximo cuidado, para evitar riscos de contaminação do analista e do laboratório. Colocar luvas, trabalhar com o material sobre bandejas, não diretamente sobre as bancadas, desinfetar todas as superfícies com solução de NaOH 1N e esterilizar todo o material de descarte a 121°C/30min.

22.6.5. Procedimento para a análise de condimentos

Descrito no Capítulo 23 do *Compendium* (Scott *et al.*, 2001).

Em um Erlenmeyer de 250ml com marcação no volume de 100ml, pesar 10g da amostra (no caso de grãos inteiros) ou 1-2g, no caso de condimentos triturados ou moídos. Adicionar água destilada estéril até completar o volume de 100ml e agitar vigorosamente, para liberar os esporos no líquido. Aquecer até a fervura, manter sob fervura por 5min e resfriar imediatamente. Aguardar a sedimentação das partículas, distribuir 20ml do líquido em seis tubos de Meio de Carne Cozida (CMM), Meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF) previamente desaerados e incubar a 30-35ºC/72h. Reincubar os tubos negativos por até sete dias. Relatar o resultado como presença ou ausência de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias na quantidade de amostra inoculada (2g no caso de grãos inteiros ou 0,2 a 0,4g no caso de condimentos triturados ou moídos).

> **Nota)** O CMM e o PE-2 não precisam ser cobertos com Ágar Selo ou Vaspar, mas o CF sim. Para o sucesso das análises, é importante garantir a ausência de resíduos de pesticidas nas ervilhas utilizadas na formulação do Meio PE-2. Além disso, antes da esterilização, as ervilhas devem permanecer uma hora de molho no caldo de cultura, para garantir a eficiência da esterilização. No caso do CF, recomenda-se que seja utilizado o meio comercial, porque, na formulação preparada em laboratório, o fígado bovino pode conter inibidores, incluindo antibióticos.

Cuidado! Os meios de cultura permitem o crescimento e a produção de toxina de *Clostridium botulinum*. Após a incubação, o manuseio e o descarte devem ser feitos com o máximo cuidado,

para evitar riscos de contaminação do analista e do laboratório. Colocar luvas, trabalhar com o material sobre bandejas, não diretamente sobre as bancadas, desinfetar todas as superfícies com solução de NaOH 1N e esterilizar todo o material de descarte a 121°C/30min.

22.6.6. Procedimento para a análise de ovo em pó, leite em pó e outros produtos lácteos em pó

Descrito no Capítulo 23 do *Compendium* (Scott *et al.*, 2001).

Adicionar 11g da amostra em um frasco com 99ml de água destilada estéril e pérolas de vidro. Agitar vigorosamente até que todo o material seja dispersado. Distribuir 20ml da suspensão homogeneizada (2g de amostra) em seis tubos de Meio de Carne Cozida (CMM), Meio PE-2 ou Caldo de Fígado (CF) previamente desaerados, transferir os tubos para um banho sob fervura por 20min, agitando constantemente durante a fervura. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os tubos até a altura da superfície do meio. Resfriar imediatamente e incubar a 30-35ºC/72h. Reincubar os tubos negativos por até sete dias. Relatar o resultado como presença ou ausência de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias na quantidade de amostra inoculada.

> **Nota)** O CMM e o PE-2 não precisam ser cobertos com Ágar Selo ou Vaspar, mas o CF sim. Para o sucesso das análises, é importante garantir a ausência de resíduos de pesticidas nas ervilhas utilizadas na formulação do Meio PE-2. Além disso, antes da esterilização, as ervilhas devem permanecer uma hora de molho no caldo de cultura, para garantir a eficiência da esterilização. No caso do CF, recomenda-se que seja utilizado o meio comercial, porque, na formulação preparada em laboratório, o fígado bovino pode conter inibidores, incluindo antibióticos.

Cuidado! Os meios de cultura permitem o crescimento e a produção de toxina de *Clostridium botulinum*. Após a incubação, o manuseio e o descarte devem ser feitos com o máximo cuidado, para evitar riscos de contaminação do analista e do laboratório. Colocar luvas, trabalhar com o material sobre bandejas, não diretamente sobre as bancadas, desinfetar todas as superfícies com solução de NaOH 1N e esterilizar todo o material de descarte a 121°C/30min.

22.6.7. Procedimento para a análise de leite fluído e queijos

Método do NMP descrito no item 8.100 do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Frank & Yousef, 2004)

Choque térmico. Para amostras de queijos, pesar 50g, preparar a primeira diluição (conforme descrito no Capítulo 2) e transferir duas porções de 200ml para dois Erlenmeyers diferentes estéreis. No caso de leite fluído, homogeneizar bem a amostra e transferir duas porções de 200ml para dois Erlenmeyers diferentes estéreis. Colocar os frascos em um banho com temperatura controlada a 82±1°C e acompanhar a subida da temperatura da amostra com um termômetro em um dos frascos. Agitar freqüentemente e garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície da amostra. Quando a amostra atingir 79°C, reduzir a temperatura do banho para 80+1ºC ou transferir para outro banho, nessa temperatura. Quando a amostra atingir a temperatura de 80ºC, contar 12min de tratamento térmico e resfriar imediatamente em banho de gelo. Se houver suspeita de esporos injuriados (como em queijo fresco), reduzir o tratamento térmico para 62,5°C/30min.

Inoculação e incubação. Selecionar três diluições adequadas da amostra e inocular uma série de três tubos de Meio Reforçado para Clostrídios (RCM) por diluição, adicionando 1ml da diluição por tubo com 10ml de RCM. Utilizar o Meio Reforçado para Clostrídios com Lactato de

Sódio (RCML) se houver interesse em favorecer *Clostridium tyrobutyricum.* Selar os tubos com Ágar Selo Tioglicolato e incubar a 37±1ºC/7 dias.

Leitura e cálculo dos resultados. Tubos com crescimento e produção de gás (deslocamento do selo de ágar para cima) são indicativos de presença de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas. Calcular o NMP de esporos/g ou ml conforme a orientação do Capítulo 4, usando uma das tabelas de NMP.

Cuidado! Os meios de cultura permitem o crescimento e a produção de toxina de *Clostridium botulinum.* Após a incubação, o manuseio e o descarte devem ser feitos com o máximo cuidado, para evitar riscos de contaminação do analista e do laboratório. Colocar luvas, trabalhar com o material sobre bandejas, não diretamente sobre as bancadas, desinfetar todas as superfícies com solução de NaOH 1N e esterilizar todo o material de descarte a 121ºC/30min.

22.6.8. Outros procedimentos

Os procedimentos do Capítulo 23 do *Compendium* não são quantitativos, seu objetivo é detectar a presença dos esporos em uma dada quantidade de amostra. Havendo interesse na quantificação, pode-se utilizar a técnica de inoculação em tubos múltiplos, determinando-se a contagem de esporos pelo método do Número Mais Provável.

Nem todos os esporos de mesófilos presentes nas amostras serão detectados, porque os diferentes grupos e espécies de clostrídios mesófilos exigem tratamentos diferenciados para a ativação dos esporos. O CMM, o CF e o PE-2 favorecem os clostrídios putrefativos e, na interpretação dos resultados é importante considerar que os bacilos anaeróbios facultativos, tanto mesófilos quanto termófilos facultativos, se presentes, também poderão ser detectados.

Para detecção dos clostrídios não proteolíticos, pode ser usado o CMM suplementado com 0,1% de amido solúvel e 0,1% de glicose, choque térmico a 60ºC/30min.

Para a detecção preferencial dos clostrídios butíricos, pode-se substituir o CMM, CF ou PE-2 pelo Ágar Dextrose Triptona (DTA) ou pelo Caldo Soro de Laranja (o ágar não é recomendado devido à quantidade de gás produzida). Choque térmico a 60ºC/30min.

22.7. MÉTODOS APHA PARA A DETECÇÃO OU CONTAGEM DE *ALICYCLOBACILLUS*

Metodologia da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 24 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Evancho & Walls, 2001).

22.7.1. Material requerido para a análise

- Água destilada estéril
- Água Salina Peptonada (H_2Osp)
- Ágar K
- Ágar ALI
- Caldo ALI
- Tubos estéreis de 25x150mm
- Placas de Petri estéreis vazias
- Esponjas estéreis
- Banho-maria a 80±1ºC com termômetro calibrado

- Banho-maria a 90±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 43±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora regulada a 45±1ºC com termômetro calibrado

22.7.2. Método de contagem em placas de Ágar K

Procedimento para a contagem em sucos de frutas simples, sucos concentrados e outros produtos ácidos, descrito no Capítulo 24 do *Compendium* (Evancho & Walls, 2001).

Choque térmico. Transferir duas porções de 10ml da amostra para dois tubos estéreis de 25x150mm. Colocar os tubos em um banho a 80ºC, controlando a temperatura de subida do produto com um termômetro introduzido em um dos tubos (controle). Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os tubos até a altura da superfície da amostra. A partir do instante em que o produto atingir a temperatura do banho, contar 10min e resfriar imediatamente em banho de gelo, descartando o tubo controle. Na análise de produtos deteriorados o choque térmico deve ser suprimido.

Inoculação e incubação. Após o choque térmico, transferir três porções de 1ml da amostra para três placas de Petri estéreis vazias e verter 15-20ml de Ágar K sobre o inóculo. Homogeneizar bem, aguardar a completa solidificação do meio e incubar a placa invertida a 43±1ºC/72h. As placas podem permanecer incubadas por mais um dia, se necessário, para facilitar a visualização das colônias.

Contagem das colônias e cálculo dos resultados. Contar todas as colônias desenvolvidas nas placas e determinar o número de Esporos/ml como a média aritmética da contagem nas três placas.

22.7.3. Teste de presença/ausência

Procedimento para a contagem em sucos de frutas simples, sucos concentrados, frutas inteiras, outros produtos ácidos e solo, descrito no Capítulo 24 do *Compendium* (Evancho & Walls, 2001).

a) Preparação da amostra para o choque térmico. No caso de sucos simples, homogeneizar a amostra por agitação e transferir duas porções de 100ml para dois frascos de 250ml. No caso de suco concentrado, diluir a 11-14º Brix com água destilada estéril e transferir duas porções de 100ml para dois frascos de 250ml. No caso de frutas inteiras, amostrar a superfície com uma esponja estéril, transferir a esponja para uma bolsa estéril e adicionar 150ml de Água Salina Peptonada (H_2Osp). Massagear a esponja por 30s, com as mãos por fora da bolsa e transferir duas porções de 5ml do líquido para dois frascos com 100ml de Caldo ALI. No caso de amostras de solo, adicionar duas porções de 5g em dois frascos com 100ml de Caldo ALI.

Nota a.1) A amostragem de frutas inteiras com esponjas, como descrita no *Compendium*, pode não ser adequada para todas as frutas. As técnicas de "swab" ou lavagem superficial (descritas no Capítulo 2), são procedimentos equivalentes. Se a contaminação esperada for baixa e a amostra destina-se apenas à detecção de *Alicyclobacillus*, a sensibilidade do método pode ser melhorada usando o Caldo ALI diretamente, em lugar da Água Salina Peptonada.

Nota a2) Na análise de polpas e purês de frutas o *Compendium* não especifica a forma de preparação das amostras para o choque térmico. Por analogia com suco concentrado, pode ser preparada uma primeira diluição (1:10) em água destilada estéril (10g amostra em 90ml de água), homogeneizando-se amostra em "stomacher", se necessário, antes da transferência para os frascos de choque térmico.

b) Choque térmico. Submeter a choque térmico em banho a 80ºC/10min, controlando a temperatura de subida do produto com um termômetro introduzido em um dos frascos (controle). Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície da amostra. A partir do instante em que o produto atingir a temperatura do banho, contar os 10min e resfriar imediatamente em banho de gelo, descartando o frasco controle.

Nota b.1) O choque térmico recomendado pelo *Compendium* nesse teste é de 90ºC/20min, sem controle do tempo de subida da temperatura. No método de contagem em placas é de 80ºC/10min, contados a partir do momento que o produto atinge a temperatura de 80ºC. A segunda opção é mais controlada, não sofrendo interferências relacionadas ao tipo de frasco ou tipo de amostra analisada. Em pesquisa desenvolvida em nosso laboratório, as melhores condições de choque térmico determinadas para *Alicyclobacillus* foram 70ºC/20min ou 80ºC/10min, descontando-se o tempo de subida da temperatura (Eiroa *et al.*, 1999).

c) Incubação e confirmação. Incubar o frasco de amostra a 45ºC e observar, periodicamente, se há desenvolvimento de turbidez ou odor estranho. Em caso positivo, estriar uma alçada da cultura em uma placa de Ágar ALI e incubar a 45ºC por até sete dias. Selecionar colônias isoladas e examinar as culturas ao microscópio. Culturas típicas de *Alicyclobacillus* são bastonetes que produzem esporos terminais, subterminais ou centrais, com leve dilatação do esporângio.

22.8. MÉTODO IFU 12:2007

Detecção e Contagem de *Alicyclobacillus*

Método da International Federation of Fruit Juice Producers (IFU 12/2007), para *Alicyclobacillus* em geral e diferenciação de cepas deteriorantes presuntivas. Aplica-se à análise de sucos de frutas, refrescos, molhos e outros produtos ácidos prontos para consumo. Aplica-se também à análise de matéria prima destinada à formulação desses produtos, incluindo polpas de frutas, sucos concentrados, xaropes, açúcar, essências, gomas, espessantes e água de processo, dentre outras.

O procedimento inclui a contagem direta em placas (plaqueamento em superfície) e o teste de presença/ausência com enriquecimento em caldo de cultura. O ensaio pode ser feito para a detecção e contagem de esporos de *Alicyclobacillus* (com choque térmico) ou para a detecção e contagem de células vegetativas (sem choque térmico). Para amostras de matéria prima, é recomendada a contagem e a detecção de esporos, após choque térmico a 80ºC/10min. Para amostras do produto final pronto para consumo, é recomendada a pré incubação da amostra a 45ºC por sete dias, seguida da contagem.

A contagem em placas é feita inoculando-se a amostra em dois meios de cultura, o Ágar K e o Ágar *Bacillus acidoterrestris* (BAT) ou o Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG). O YSG e o BAT permitem o crescimento de *Alicyclobacillus* em geral, sendo utilizado para a detecção de qualquer espécie presente. O Ágar K, incubado a 45ºC, permite o crescimento vigoroso de *A. acidoterrestris* e limita o crescimento de *A. acidocaldarius* e *A. acidiphilus*. É utilizado para favorecer o desenvolvimento preferencial de colônias de *A. acidoterrestris*.

Nos dois meios as colônias são presuntivas e devem ser confirmadas. Para confirmar se a cultura pertence ao gênero *Alicyclobacillus*, é verificada a morfologia de bastonetes das células, a produção de esporos e a inabilidade de crescer em pH neutro, que são características típicas de todas as espécies. Para verificar se a cultura é deteriorante presuntiva, é verificada a capacidade de

crescimento a 65ºC e pode ser aplicado o teste de peroxidase para a produção de guaiacol, que é opcional. O teste de peroxidase verifica a capacidade da cepa em produzir guaiacol a partir de ácido vanílico. A espécie mais freqüente em produtos deteriorados é *A. acidoterrestris*, que não cresce a 65ºC e dá resultado positivo no teste de peroxidase. O resultado é considerado presuntivo para deteriorantes porque há outras espécies que dão resultados similar, incluindo *A. acidiphilus* e *A herbarius*, mas que não necessariamente produzem guaiacol em sucos de frutas.

22.8.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Frascos com 90ml de Caldo Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) (para a análise de matéria prima em geral) (pode ser substituído pelo Caldo *Bacillus acidoterrestris* - BAT)
- Frascos com 100ml de Caldo Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) em concentração dupla (para a análise de água) (pode ser substituído pelo Caldo *Bacillus acidoterrestris* - BAT em concentração dupla)
- Frascos com 90ml de água destilada estéril (para a análise sucos concentrados)
- Placas de Ágar K
- Placas de Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG)
- Placas de Ágar *Bacillus acidoterrestris* (BAT) (opcional, podendo ser substituído pelo YSG)
- Placas de Ágar Padrão Para Contagem (PCA) ou o Ágar Tripticase de Soja (TSA) ou o Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI)
- Reagentes para coloração de esporos (opcional)
- Banho-maria a 80±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora a 45±1ºC com termômetro calibrado
- Estufa incubadora a 65±1ºC com termômetro calibrado

22.8.2. PROCEDIMENTO PARA A ANÁLISE DE MATÉRIA PRIMA

Aplicação: Procedimento para a contagem e detecção da presença/ausência de esporos de *Alicyclobacillus* em matéria prima (sucos concentrados de frutas, polpas de frutas, xaropes, açúcar, essências, gomas, espessantes, água de processo e outras) destinada à formulação sucos de frutas, refrescos, molhos e outros produtos ácidos termoprocessados prontos para consumo.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Choque térmico

a.1) Para a análise de amostras sólidas, concentradas ou pastosas de matéria prima em geral (polpas de frutas, xaropes, açúcar, essências, gomas, espessantes e outros). Homogeneizar duas porções 10g da amostra em dois frascos com 90ml de Caldo Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) ou Caldo *Bacillus acidoterrestris* (BAT). Submeter a choque térmico em banho-maria a 80±1ºC/10min. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície da amostra. Controlar subida da temperatura do produto com um termômetro introduzido em um dos frascos (controle). O tempo de subida até 80ºC não deve ultrapassar cinco minutos. Após o choque térmico, descartar o frasco controle.

Nota a.1) No caso de gomas e espessantes, será necessário utilizar uma diluição maior, como 1:50 (10g da amostra em 490ml de caldo) ou 1:100 (10g da amostra em 990ml de caldo), dependendo do produto.

a.2) Para a análise de amostras de sucos concentrados. Diluir duas porções 10g da amostra em dois frascos com 90ml de água destilada estéril. Submeter a choque térmico da mesma forma descrita para matéria prima.

a.3) Para a análise de água. Transferir duas porções de 100ml da amostra para dois frascos com 100ml de Caldo Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) ou Caldo *Bacillus acidoterrestris* (BAT) em concentração dupla. Submeter a choque térmico da mesma forma descrita para matéria prima.

b) Inoculação para a contagem dos esporos

Após o choque térmico, inocular 0,1ml da amostra em uma placa de Ágar K (plaqueamento em superfície) e 0,1ml em uma placa de Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) ou Ágar Bacillus acidoterrestris (BAT) (plaqueamento em superfície). Incubar as placas a 45±1ºC por dois a cinco dias, observando diariamente.

Nota b.1) Para melhorar o limite de detecção do método, pode-se inocular 1ml da amostra, distribuindo o volume por quatro placas, três com 0,3ml e uma com 0,1ml.

c) Enriquecimento para a detecção (presença/ausência) dos esporos

Após a retirada do inóculo para a contagem dos esporos, incubar o restante da amostra a 45±1ºC por cinco dias, para enriquecimento. Após a incubação, inocular uma alçada do material em uma placa de Ágar K (estrias de esgotamento) e uma alçada em uma placa de Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) ou Ágar *Bacillus acidoterrestris* (BAT) (estrias de esgotamento). Incubar as placas a 45±1ºC por dois a cinco dias, observando diariamente.

Nota c.1) O plaqueamento pode ser feito com dois dias de incubação, mas, em caso negativo, deve ser repetido com cinco dias.

d) Confirmação das colônias presuntivas

Examinar as colônias desenvolvidas nos dois meios inoculados. Selecionar um número representativo de cada tipo de colônia presente em cada placa, para a confirmação. A partir da mesma colônia, inocular cada cultura (estrias de esgotamento) nos meios cultura para os testes de confirmação abaixo.

Nota d.1) A IFU 12/2007 não determina um número mínimo de colônias para a confirmação. Como orientação, pode-se seguir a prática dos métodos da ISO para contagem de microrganismos em placas, que estabelece cinco colônias de cada placa e, se houver menos de cinco, todas. Escolher colônias de diferentes tipos para a confirmação. No YSG ou no BAT, que permitem o crescimento de *Alicyclobacillus* em geral, pode haver uma variedade maior de tipos de colônias, em comparação com o Ágar K, que é mais favorável a *A. acidoterrestris* e restritivo para *A. acidocaldarius* e *A. acidiphilus*. Nesse caso, é recomendável selecionar pelo menos uma colônia de cada tipo presente no BAT ou YSG.

d.1) Para verificar a morfologia das células e a formação de esporos, inocular uma alçada da colônia em uma placa de Ágar K e uma alçada em uma placa de YSG. Incubar as placas a 45±1ºC por três a cinco dias. A partir da cultura desenvolvida no Ágar K, verificar a

formação de esporos em observação microscópica (montagem úmida ou coloração de esporos, descritos no Capítulo 5). Se não houver crescimento no Ágar K, utilizar cultura obtida na placa de YSG para a observação. As espécies de *Alicyclobacillus* formam esporos.

d.2) Para verificar o crescimento em pH neutro, inocular uma alçada da colônia em uma placa de um meio com pH neutro, como o Ágar Padrão Para Contagem (PCA) ou o Ágar Tripticase de Soja (TSA) ou o Ágar Infusão Cérebro Coração (BHI). Incubar as placas a 45±1ºC por três a cinco dias. Culturas de *Alicyclobacillus* são acidófilas estritas e não crescem em pH neutro.

d.3) Para verificar o crescimento a 65ºC, inocular uma alçada da colônia em uma placa de YSG e incubar 65±1ºC por três a cinco dias. As espécies de *Alicyclobacillus* consideradas deteriorantes presuntivas no método IFU 12/07 não crescem a 65ºC.

d.4) Teste de peroxidase para produção de guaiacol (opcional). A IFU 12/07 recomenda que esse teste seja feito com o "kit" comercial da Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co. Ltda, Japan (contact: inagaki@kyokutoseiyaku.com.jp), seguindo a orientação do fabricante.

22.8.3. PROCEDIMENTO PARA A ANÁLISE DE PRODUTO FINAL

Aplicação: Procedimento para a contagem de *Alicyclobacillus* em sucos e néctares de frutas, refrescos, molhos e outros produtos ácidos termoprocessados prontos para consumo (produto final), que oferecem condição para a multiplicação de *Alicyclobacillus*.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

a) Pré incubação

Antes do ensaio, incubar a amostra, em sua embalagem original, fechada, por sete dias a 45±1ºC. A pré incubação é indispensável para amostras de produtos recém processados. No caso de amostras coletadas no varejo é opcional e, no caso de amostras deterioradas, não é necessária.

b) Inoculação e incubação

Homogeneizar bem o conteúdo da embalagem antes da abertura. Inocular 0,1ml da amostra em uma placa de Ágar K (plaqueamento em superfície) e 0,1ml em uma placa de Ágar Extrato de Levedura Amido Glicose (YSG) ou Ágar *Bacillus acidoterrestris* (BAT) (plaqueamento em superfície). Incubar as placas a 45+1ºC por dois a cinco dias, observando diariamente.

Nota b.1) Para melhorar o limite de detecção do método, pode-se inocular 1ml da amostra em cada meio de cultura, distribuindo o volume por quatro placas, três com 0,3ml e uma com 0,1ml. Se a amostra for líquida e límpida, sem sólidos em suspensão, pode-se filtrar duas porções de 100ml em filtro-membrana de poro 0,45µm e transferir as membranas para as placas de meio de cultura. O volume de 100ml também pode ser dividido em duas porções de 50ml para cada meio de cultura.

Nota b.2) Se ao final de cinco dias não houver desenvolvimento de colônias, mas o produto apresentar evidência de presença de *Alicyclobacillus*, recomenda-se repetir o ensaio com a aplicação de choque térmico (ativação de esporos). Para tanto, transferir duas porções de 100ml da amostra para dois frascos estéreis vazios e submeter a choque térmi-

co em banho-maria a 80±1ºC/10min. Garantir que o volume de água do banho seja suficiente para cobrir os frascos até a altura da superfície da amostra. Controlar subida da temperatura do produto com um termômetro introduzido em um dos frascos (controle). O tempo de subida até 80ºC não deve ultrapassar cinco minutos. Após o choque térmico, descartar o frasco controle e repetir o plaqueamento.

c) Confirmação das colônias presuntivas

Da mesma forma descrita para a análise de matéria prima, no item 22.8.2.d.

22.8.4. INTERPRETAÇÃO E CÁLCULO DOS RESULTADOS

Utilizar as características abaixo na interpretação dos resultados da confirmação.

Característica	Perfil 1 *Alicyclobacillus* spp	Perfil 2 *Alicyclobacillus* potencialmente deteriorantes (principalmente *A. acidoterrestris*)
Crescimento em Ágar YSG ou BAT a 45ºC	+	+
Crescimento em pH neutro (PCA/TSA/BHI) a 45ºC	-	-
Formação de esporos	+	+
Crescimento em YSG ou BAT a 65ºC	+	-
Crescimento em Ágar K	A maioria negativo	+

Considerar como pertencente ao gênero *Alicyclobacillus* todas as culturas que apresentarem os perfis 1 ou 2.

Considerar como *Alicyclobacillus* potencialmente deteriorante apenas as culturas que apresentarem o perfil 2.

Calcular o número de UFC/g ou ml em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas.

Exemplo. Plaqueamento em superfície, inoculados 0,1ml da diluição 10^{-1}, 25 colônias presentes, cinco submetidas à confirmação, três confirmadas (60%).

UFC/g ou ml = $25x10x10^{1}x0,6 = 1,5x10^{3}$.

22.9. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L., RAINEY, F.A., CHUNG, A.P. *et al.*, 2000. *Alicyclobacillus hesperidium* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50**:451-457.

ALLAN, R.N., LEBBE, L. HEYRMAN, J. *et al.*, 2005. *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria land, Antarctica. **Int. J. Syst. Evol. Microbiolog. 55**:1039-1050.

ASH, C., PRIEST, F.G. & COLLINS, M.D, 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek 64**:253-260. (Validation List N° 51, Int. J. Syst. Bacteriol. **44**, 852, 1994).

ASHTON, D. & BERNARD, D.T. Thermophilic anaerobic sporeformers. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 26, p. 249-252.

BANAT, I. M., MARCHANT, R., RAHMAN, T. J., 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54**:2197-2201.

BANKS, J.G. The spoilage potencial of *Sporolactobacillus*. **Technical Bulletin Nº 66**, The Campden Food and Drink Research Association, England, 1989.

BRODA, D.M., LAWSON, P.A., BELL, R.G. & MUSGRAVE, D.R., 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with "blown pack" spoilage of vacuum-packed meats. **Int. J. Syst. Bacteriol. 49**, 1539-1550.

BRODA, D.M., SAUL, D.J., LAWSON, P.A., BELL, R.G. & MUSGRAVE, D.R., 2000. *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meats. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50**:107-118.

BROWN, K.L., 1995. New microbiological challenges in aseptics: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage in aseptically packed fruit juices. In: OHISSON, T. (ed.), **Advances in Aseptic Processing and Packaging Technologies, International Symposium Proceedings**, Copenhagen, Denmark. p. 1-14.

CAMPBELL, L.L. & POSTGATE, J.R., 1965. Classification of the spore-forming sulfate-reducing bacteria. **Bacteriological Reviews 29(3)**:359-363.

CANN, I.K.O., STROOT,P.G., MACKIE, K.R. *et al.*, 2001. Characterization of two novel saccharolytic, anaerobic thermophiles, *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* sp. nov. and *Thermoanaerobacterium zeae* sp. nov., and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51**:293-302.

COLLINS, M.D., RODRIGUES, U.M., DAINTY, R.H., EDWARDS, R.A. & ROBERTS, T.A., 1992. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. **FEMS Microbiol. Lett. 96**, 235-240.

CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica). **Manual de Botulismo – Orientação para Profissionais de Saúde**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2002. Disponível no site <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_manual.htm>, acesso em 04/01/07.

CVE (Centro de Vigilância Epidemiológica). Botulismo – Estado de São Paulo e Brasil – Casos suspeitos e confirmados notificados ao Centro de Referência de Botulismo (CR BOT) de 1999 a 2006. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2006. Disponível no site <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/botulismo05_dados.ppt>, atualizado em 28/08/06, acesso em 04/01/07.

DAINTY, R.H., EDWARDS, R.A., HIBBARD, C.M., 1989. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. **Journal of the Science of Food and Agriculture 49**:473-486.

DeCLERCK, E., RODRIGUEZ-DIAZ, M., FORSYTH, G. *et al.*, 2004. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. **Syst. Appl. Microbiol. 27**:50-60.

DEINHARD, G., BLANZ, P., POROLLA, K., ALTAN, E., 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. **Syst. Appl. Microbiol. 10**:47-53.

DeVECCHI, E. & DRAGO, L., 2006. *Lactobacillus sporogenes* or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabelling? **International Journal of Probiotics and Prebiotics 1(1)**:3-10.

DONNELLY, L.S. & HANNAH, T., 2001. Sulfide spoilage sporeformers. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 27, p. 253-255.

DOTZAUER, C., EHRMANN, M.A., VOGEL, R.F., 2002. Occurrence and detection of *Thermoanaerobacterium* and *Thermoanaerobcter* in canned food. **Food Technol.Biotechnol. 40**(1)**:**21-26.

DSMZ, 2006. **Bacterial nomenclature up-to-date.** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH**.** URL: <http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14**>**. Acesso em 10/10/06.

EIROA, M.N.U., JUNQUEIRA, V.C.A., SCHMIDT, F.L., 1999. *Alicyclobacillus* in orange juice:occurrence and heat resistance of spores. **J. Food Protec. 62**(8):883-886.

EUZÉBY, J.P., 2006. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol**., 1997, **47**, 590-592. (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Last full update February 2006. URL: http://www.bacterio.net).

EVANCHO, G. M.; WALLS, I. Aciduric Flat Sour Sporeformers. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 24, p. 239-244.

FRANK, J.F. & YOUSEF, A.E. Tests for groups of microrganisms. In: WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2004. Chapter 8, Section 8.090 and 8.100, p.239-242.

FSIS/USDA, 1997. **Generic HACCP Model for Thermally Processed Commercially Sterile Meat and Poultry Products**. Food Safety Inspection Service, United States Department of Agriculture, April 1997. Disponível no site <http://haccpalliance.org/alliance/haccpmodels/thermal.pdf>, acesso em 06/10/06.

GOTO, K., MOCHIDA, K., ASAHARA, M. *et al.*, 2003. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does nor possess w-alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53**:1537-1544.

GOTO, K., FUJITA, R., KATO, Y. *et al.*, 2004. Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (= NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus dnicus* sp. nov and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54**:419-427.

GOUWS, P.A., GIE, L., PRETORIUS, A., DHANSAY, N. 2005. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. **International Journal of Food Science & Technology 40(7)**:789-792.

HAUSCHILD, A.H.W., 1989. *Clostridium botulinum***.** In: DOYLE, M.P. (ed)**, Foodborne Bacterial Pathogens,** Marcel Dekker Inc.

HEYNDRICKX, M., LEBBE, L., VANCANNEYT, M. *et al.*, 1997. A polyphasic reassessment of the genus *Aneurinibacillus*, reclassification of *Bacillus thermoaerophilus* (Meier-Stauffer *et al.*, 1996) as *Aneurinibcillus thermoaerophilus* comb. nov., and emended description of *A. Aneurinilyticus* corrig., *A. migulanus*, and *A. thermoaerophilus*. **Int. J. Syst. Bacteriol. 47(3)**:808-817.

HEYNDRICKX, M., LEBBE, L., KERSTERS, K. *et al.*, 1998. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenticus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenticus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.48**:99-106.

HEYRMAN, J., LOGAN, N.A., BUSSE, H.J. *et al.*, 2003. *Virgibacillus carmonensis* sp.nov., *Virgibacillus necropolis* sp.nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paitings, transfer pf the species of the genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of the genus *Virgibacillus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53**:501-511.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, ST. (eds). **Bergey's Manual of Determinative Bacterilogy, 9th Ed.** Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

HORN, M.A., IHSSEN, J., MATTHIES, C. *et al.*, 2005. *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N_2O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55**:1255-1265.

HUNT, M.E. & RICE, E.W. Microbiological examination. In: EATON *et al.* (Eds), **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed**. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000, Section 9218, p.9.47-9.48.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. **Microrganisms in Foods 5 – Microbiological Specifications of Food Pathogens**. Blackie Academic & Professional, Chapter 5, p. 66-111.

IFU 12/2007. **Method on the detection of taint producing *Alicyclobacillus* in fruit juices.** International Federation of Fruit Juice Producers, 2004, revised 2007.

KALCHAYANAND, N. RAY, B., FIELD, R.A. & JOHNSON, M.C., 1989. Spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef by *Clostridium*. **J. Food Protec. 54**:424-426.

KALCHAYANAND, N. RAY, B. & FIELD, R.A. 1993. Characteristics of psychrotrophic Clostridium laramie causing spoilage of vacuum-packaged refrigerated fresh and roasted beef. **J. Food Protec. 56**:13-17.

KALOGRIDOU-VASSILIADOU, D., 1992. Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. **J. Dairy Sci. 75**:2681-2686.

KARAVAIKO, G.I., BOGDANOVA, T.I., TOUROVA, T.P. *et al.*, 2005. Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidoixidans* Dufresne *et al.* 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55**:941-947.

LAWSON, P., DAINTY, R.H., KRISTIANSEN, N. *et al.*, 1994. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. **Lett. Appl. Microbiol. 19**, 153-157.

LEE, Y.E., JAIN, M.K., LEE, C. *et al.*, 1993. Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gen. nov., sp. nov.; reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively; and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E to *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Int. J. Syst. Bacteriol. 43**, 41-51.

LIM, J.M., JEON, C.O., LEE, J.C. *et al.*, 2006. *Paenibacillus gansuensis* sp. nov., isolated from desert soil of Gansu Province in China. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.56**:2131-2134.

LIU, S.Y., RAINEY, F.A., MORGAN, H.W. *et al.*, 1996. *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a slighlty acidophilic, anaerobic thermophile isolated from various hor springs in New Zealand, and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*, **Int. J. Syst. Bacteriol. 46(2)**:388-396.

LOGAN, N.A., FORSYTH, G., LEBBE, L. *et al.*, 2002. Polyphasic identification of *Bacillus* and *Brevibacillus* strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of *Brevibacillus invocatus* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52**:953-966.

MATSUBARA, H., GOTO, K., MATSUMURA, T. *et al.*, 2002. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, w-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52**:1681-1685.

MEEHAN, C., BJOURSON, A.J., McMULLAN, G., 2001. *Paenibacillus azoreducens* sp. nov., a synthetic azo dye decolorizing bacterium from industrial wastewater. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.51**:1681-1685.

MONTES, M.J., MERCADÉ, E., BOZAL, N., GUINEA, J., 2004. *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.54**:1521-1526.

NAKAMURA, L.K., BLUMENSTOCK, I., CLAUS, D., 1988. Taxonomic study of *Bacillus coagulans* Hammer 1915 with a proposal for *Baillus smithii* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol. 38(1)**:63-73.

NAZINA, T.N., TOUROVA, T.P., POLTARAUS, A.B. *et al.*, 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51**, 433-446.

NAZINA, T.N., SOKOLOVA, D.S., GRIGORYAN, A.A. *et al.*, 2005. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and validation of the *Geobacillus* species. **Syst. Appl. Microbiol. 28**:43-53.

OLSON, K.E. & SORRELLS, K.M. Thermophilic flat sour sporeformers. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 25, p.245-248.

PETTERSSON, B., LEMBKE, F., HAMMER,P., STACKBRANDT, E., PRIEST, F.G., 1996. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. **Int. J. Syst. Bacteriol. 46**:759-764.

PIKUTA, E., LYSENKO, A., SUZINA, N. *et al.*, 2000. *Desulfotomaculum alkaliphilum* sp. nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50**:25-33.

PINHATTI, M.E.M.C., VARIANE, S., EGUCHI, S.Y., MANFIO, G.P., 1997. Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. **Fruit Processing 9**:350-353.

RICHMOND, B. & FIELDS, M.L., 1966. Distribution of thermophilic aerobic sporeforming bacteria in food ingredients. **Appl. Microbiol. 14(4)**:623-626.

SAHA, P., MONDAL, A.K., MAYILRAJ, S. *et al.*, 2005. *Paenibacillus assamensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a warm spring in Assam, India. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**.**55**:2577-2581.

SCHELDEMAN, P., GOOSENS, K., RODRIGUEZ-DIAZ, M., PIL, A., GORIS, J., HERMAN, L., De VOS, P., LOGAN, N. A., HEYNDRICKX, M., 2004. *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54**: 885-891.

SCHELDEMAN, P., PIL, A., HERMAN, L., De VOS, P., HEYNDRICKX, M., 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farmers. **Appl. Environm. Microbiol. 71(3)**:1480-1494.

SCHELDEMAN, P., HERMAN, L., FOSTER, S., HEYNDRICKX, M., 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. **J. Appl.Microbiol. 101**:542-555.

SCOTT, V.N., ANDERSON, J.E. & WANG, G. Mesophilic anaerobic sporeformers. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 23, p. 229-237.

SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., KOMAGATA, K., 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen.nov. **Int. J. Syst. Bacteriol. 46**:939-946.

SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K. *et al.* 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus.* **Int. J. Syst. Bacteriol. 47**:289-298.

SIMBAHAN, J., DRIJBER, R., BLUM, P., 2004. *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54**:1703-1707.

SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2.** Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.

SPRING, S., MERKHOFFER, B., WEISS, N. *et al.*, 2003. Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53**:1019-1029

STEVENSON, K.E. & SEGNER, W.P. Mesophilic aerobic sporeformers. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 22, p. 223-227.

STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing, 2nd Ed**. Academic Press, New York, 1973.

UETANABARO, A.P., WAHRENBURG, C., HUNGER, W., *et al.*, 2003. *Paenibacillus agarexedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. **53**:1051-1057.

VANDIEKEN, V., KNOBLAUCH, C. & JORGENSEN, B.B., 2006. *Desulfotomaculum arcticum* sp. nov., a novel spore-forming, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a permanently cold fjord sediment of Svalbard. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56**:687-690.

WHITE, D., SHARP, R.J., PRIEST, F.G., 1993. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area. **Antonie van Leuwenhoec 64**:357-386.

WISOTZKEY, J.D., JURTSHUK Jr., P., FOX, G.E. *et al.*, 1992. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol. 42**, 263-269.

YANAGIDA, F., SUZUKI, K, KOZAKI, M., KOMAGATA, K., 1997. Proposal of *Sporolactobacillus nakaiamae* subsp. *nakayamae* sp. nov., subsp. nov., *Sporolactobacillus nakaiamae* subsp. *racemicus* subsp. nov., *Sporolactobacillus terrae* sp. nov., *Sporolactobacillus kofuensis* sp. nov., and *Sporolactobacillus lactosus* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol. 47(2)**:499-504.

YOON, J.H., KANG, S.J., LEE, S.Y. *et al.*, 2005. *Virgibacillus dokdonensis* sp. nov., isolated from a Korean island, Dokdo, located at the edge of the esat sea in Korea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiolo. 55**:1833-1837.

Capítulo 23

Teste de esteliridade comercial ou causa da deterioração

23.1. INTRODUÇÃO

As informações abaixo são do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Deibel & Jantschke, 2001, Denny & Parkinson, 2001) e do *Bacteriological Analytical Manual Online* (Landry *et al.*, 2001).

Definição de esterilidade comercial

No âmbito deste capítulo, o termo “alimentos comercialmente estéreis” refere-se a produtos alimentícios submetidos à tratamento térmico e acondicionados em embalagens herméticas, capazes de impedir a entrada de microrganismos. O acondicionamento pode ser feito em latas, embalagens de vidro, embalagens flexíveis (“pouches”) ou embalagens cartonadas (caixinhas). De maneira geral, as latas e as embalagens de vidro são seladas a vácuo, enquanto os “pouches” e caixinhas podem conter pouco ou nenhum vácuo. Esses produtos são microbiologicamente estáveis, podendo ser mantidos indefinidamente à temperatura ambiente.

A esterilidade comercial é atingida nas seguintes condições:

a) aplicação de calor suficiente para tornar o alimento isento de (1) microrganismos capazes de se reproduzir no produto, em condições de estocagem e distribuição não-refrigerada e (2) microrganismos patogênicos viáveis, inclusive esporos.

b) aplicação combinada de calor e redução do pH ou calor e redução da atividade de água, suficientes para tornar o alimento isento de microrganismos capazes de se desenvolver no produto, sob estocagem não-refrigerada.

Classificação dos alimentos comercialmente estéreis

A definição de esterilidade comercial deixa claro que um alimento comercialmente estéril pode conter microrganismos viáveis, desde que não sejam capazes de se multiplicar no produto, à temperatura ambiente. O dimensionamento dos processos térmicos, ou seja, a quantidade de calor que deve ser aplicada, depende da resistência térmica dos microrganismos capazes de se multiplicar nessa condição. Os tipos microbianos que podem crescer, por sua vez, dependem do pH e da atividade de água do produto, porque interferem no crescimento dos microrganismos. Em função do pH, Cameron & Esty (apud Herson & Hulland, 1980) dividiram os alimentos em quatro grupos:

Grupo 1. Alimentos pouco ácidos, com pH acima de 5,3 (ervilha, milho, vagens, carnes, peixes, leite).

Grupo 2. Alimentos levemente ácidos, com pH entre 5,3 e 4,5 (espinafre, aspargos, beterrabas, sopas, molhos).

Grupo 3. Alimentos ácidos, com pH entre 4,5 e 3,7 (tomates, pêras, abacaxis, figos).
Grupo 4. Alimento altamente ácidos, com pH menor do que 3,7 (chucrute, picles, sucos de frutas cítricas).

Em função do pH e da atividade de água, a Food and Drug Administration (FDA) classifica os alimentos comercialmente estéreis como de baixa acidez ou ácidos (Landry *et al*, 2001).

Alimentos de baixa acidez. Incluem os produtos com pH maior que 4,6 e atividade de água maior que 0,85 (exceto bebidas alcoólicas), como os derivados de carne (salsichas em lata, almôndegas em lata, patês de fígado ou presunto em lata ou vidro), derivados de peixes (sardinha em lata, atum em lata), derivados de leite (leite longa vida, creme de leite em lata ou caixinha), vegetais em lata ou vidro (ervilha, milho, seleta de legumes) e misturas (feijoada em lata, sopas em lata). Permitem o crescimento da maioria dos microrganismos, porque o pH e a atividade de água não são restritivos. Tanto espécies patogênicas quanto não patogênicas podem crescer, incluindo esporogênicas e não esporogênicas. O alvo do processo de esterilização, nesse caso, são os esporos bacterianos e, dentre eles, os de *Clostridium botulinum*, porque é a espécie de maior risco para a saúde pública.

Alimentos ácidos. Incluem os produtos com pH menor ou igual a 4,6, como os derivados de tomate, os vegetais acidificados (palmito, picles, azeitonas), as frutas em calda (figos, pêssegos, abacaxi) e os sucos de frutas em lata ou caixinha. Permitem o crescimento de uma gama menor de microrganismos, porque o pH é restritivo. Podem crescer os bolores, as leveduras e as bactérias acidúricas. Dentre as bactérias acidúricas encontram-se *Lactobacillus* e outras bactérias lácticas (não esporogênicas) e algumas espécies esporogênicas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Alicyclobacillus* e *Sporolactobacillus*. Os microrganismos alvo do processo, nesse caso, não é pré estabelecido, porque dependem do produto. Nos alimentos com pH levemente ácido (4,2-4,4), os clostrídios sacarolíticos (*C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii* e *C. acetobutylicum*) devem ser considerados, bem como *Bacillus coagulans*. Nos produtos mais ácidos, apenas *Alicyclobacillus*, bolores, leveduras e bactérias lácticas podem crescer. Nos produtos com atividade de água abaixo de 0,85, apenas bolores e leveduras são relevantes.

23.1.1. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS MICRORGANISMOS

As informações abaixo são de Stumbo (1973). Dois parâmetros são utilizados para avaliar a resistência térmica dos microrganismos: o tempo de redução decimal (valor D), determinado através da curva de sobrevivência e o coeficiente de temperatura (valor z), determinado através da curva de destruição térmica.

Curva de sobrevivência e tempo de redução decimal (valor D)

Na destruição de microrganismos expostos a uma temperatura letal constante, a redução do número de células viáveis ao longo do tempo é exponencial. Isso significa que, num gráfico com o logaritmo do número de sobreviventes no eixo y e o tempo de exposição no eixo x (Figura 23.1), a curva de sobrevivência obtida é uma reta, descrita pela equação (1) de primeira ordem:

Equação (1) $$\text{Log } N_0 - \text{Log } N_f = t/D$$

N_0 = número inicial de microrganismos
N_f = número final de microrganismos (número de sobreviventes)
t = tempo (em minutos) de exposição à temperatura letal constante
D = tempo (em minutos) de redução decimal

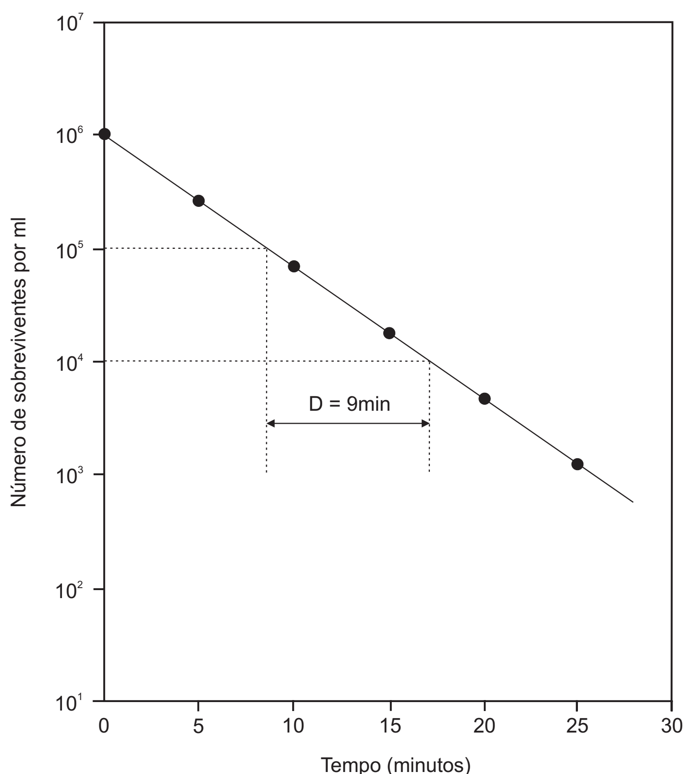


Figura 23.1. Curva de sobrevivência e determinação do valor D.

O valor D, também chamado de razão letal, é definido como o tempo (em minutos) necessário para reduzir a 1/10 a população de um dado microrganismo, a uma dada temperatura. Em outras palavras, é o tempo necessário para promover uma redução decimal na população ou, ainda, para destruir 90% da população. O valor D é característico de cada microrganismo e estabelecido a cada temperatura, separadamente. Por isso, a notação usada para o valor D é sempre acompanhada da temperatura de referência usada na determinação. Exemplo: $D_{121,1^{\circ}C}$ = 4-5min para esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, significando que o valor D de *G. stearothermophilus* a 121ºC é de 4 a 5min.

O parâmetro D define a inclinação da curva de sobrevivência e, quanto menor for o seu valor, mais rápida é a destruição do microrganismo testado, ou seja, menor a sua resistência à temperatura de referência. Além de avaliar a resistência térmica de um dado microrganismo, o valor D também permite comparar a resistência entre microrganismos. Exemplo 1: Uma espécie que tenha $D_{121^{\circ}C}$ = 4min é muito mais resistente do que uma que tenha $D_{121^{\circ}C}$ = 0,1min, porque são necessários quatro minutos a 121ºC para destruir 90% da população da primeira e apenas seis segundos, à mesma temperatura, para destruir 90% da população da segunda. Exemplo 2: Uma espécie que tenha $D_{121^{\circ}C}$ = 0,5min é muito mais resistente do que uma que tenha $D_{85^{\circ}C}$ = 0,5min, porque, com o mesmo tempo de tratamento, 90% da segunda foi destruída numa temperatura muito mais baixa do que a primeira.

Número de reduções decimais

A equação (1) da curva de sobrevivência também pode ser escrita como: $\mathbf{t/D = Log(N_0/N_f)}$

Se t for igual a 1D temos: $1D/D = Log(N_0/N_f) \rightarrow Log(N_0/N_f) = 1 \rightarrow N_0/N_f = 10 \rightarrow N_f = N_0/10 \rightarrow$ uma redução decimal, que é a definição do valor D.

Se t for igual a 2D temos: $2D/D = Log(N_0/N_f) \rightarrow Log(N_0/N_f) = 2 \rightarrow N_0/N_f = 10^2 \rightarrow N_f = N_0/10^2$ $\rightarrow$ duas reduções decimais.

Então, como regra geral, se um microrganismo for exposto a uma temperatura letal constante, por um intervalo de tempo múltiplo do seu valor D nessa temperatura (**nD**), o número de sobreviventes será $\mathbf{N_f = N_0/10^n}$ e o número de reduções decimais será **n**.

Curva de destruição térmica e coeficiente de temperatura (valor z)

O valor D permite avaliar e comparar a resistência dos microrganismos em uma dada temperatura, constante, mas não oferece informação sobre a influência da variação da temperatura sobre a resistência. Essa informação é dada pela curva de destruição térmica, que reflete a resistência relativa dos microrganismos a diferentes temperaturas.

A curva de destruição térmica, também chamada de curva de tempo de morte térmica, é determinada graficamente (Figura 23.2), a partir de vários valores D do microrganismo testado, obtidos em diferentes temperaturas. Colocando-se no eixo y o logaritmo do valor D e no eixo x o valor da temperatura em que esse valor D foi obtido, a curva de destruição térmica é uma reta que segue a seguinte equação:

$$\textbf{Equação (2)} \quad \text{Log } D_{T2} - \text{Log } D_{T1} = (T1 - T2)/z$$

onde:

D_{T1} = valor D à temperatura T1.

D_{T2} = valor D à temperatura T2.

z = variação de temperatura de redução decimal = coeficiente de temperatura

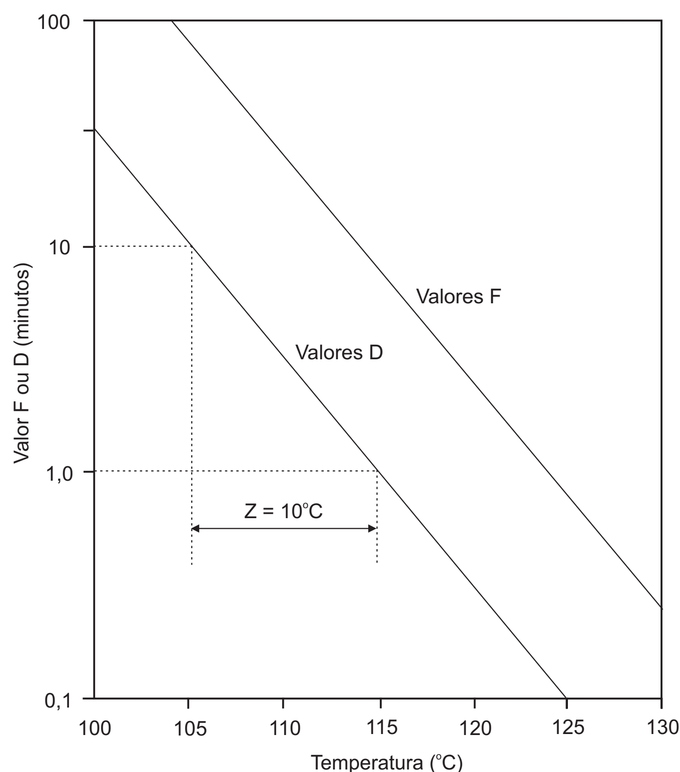


Figura 23.2. Curva de destruição térmica e determinação do valor z.

O valor z é definido como a variação de temperatura (em ºC) necessária para provocar uma variação de dez vezes no valor D, ou seja promover uma redução ou uma elevação decimal no valor D. Por exemplo, se um dado microrganismo apresenta $D_{100ºC}$ = 10min e z = 10ºC, uma elevação de 10ºC na temperatura de tratamento reduziria a 1/10 o tempo necessário para produzir o mesmo efeito letal, ou seja, $D_{110ºC}$ seria igual a 1min, $D_{120ºC}$ igual a 0,1min e assim por diante. Assim como o valor D, o valor z é característico de cada espécie microbiana e determinado individualmente para cada microrganismo.

O valor z permite comparar o efeito da variação da temperatura na velocidade de destruição de diferentes microrganismos. Por exemplo, uma espécie que tenha z = 5ºC é mais sensível à elevação da temperatura do que uma espécie que tenha z = 10ºC, porque uma elevação de 5ºC acelera em dez vezes a velocidade de sua destruição, enquanto o segundo exige uma variação de 10ºC, para essa mesma aceleração.

23.1.2. VALORES D E Z DE MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

Os valores de D e z de diversos microrganismos de importância em alimentos encontram-se descritos no Quadro 23.1.

Células vegetativas

As células vegetativas dos microrganismos são sensíveis à temperaturas relativamente baixas. Poucos minutos de permanência a 65,5ºC são suficientes para destruir bolores, leveduras e bactérias, que apresentam $D_{65,5ºC}$ não superior a 2-3min, na maioria dos casos.

Esporos de bolores termorresistentes

Alguns fungos filamentosos produzem esporos resistentes ao calor. Esses bolores são chamados de termorresistentes, incluindo as espécies *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartoria fischeri*, *Talaromyces flavus*, *Talaromyces bacillisporus* e *Eupenicillium brefeldianum*. Os esporos de *B. fulva* têm valor $D_{90ºC}$ de um a 12min (Bayne & Michener, 1979) e valor z entre 6 e 7ºC (King *et al.*, 1969). A resistência térmica de *B nivea* é ligeiramente inferior, com $D_{88ºC}$ de 0,75 a 0,8min e valor z entre 6 e 7ºC (Casella *et* al., 1990). A resistência térmica de *N. fischeri* é similar à de *B. fulva* (Splittstoesser & Splittstoesser, 1977).

Esporos de bactérias

Algumas bactérias também são capazes de produzir esporos, cujas características estão descritas no capítulo específico de contagem de esporos de bactérias. Os esporos bacterianos são diferentes dos esporos dos bolores termorresistentes, não sendo estruturas de reprodução, mas sim, estruturas de resistência. Não são metabolicamente ativos, como as células vegetativas. Permanecem em estado de dormência e, em condições favoráveis, germinam e dão origem a novas células vegetativas. Sua resistência térmica varia com as espécies, algumas comparando-se aos bolores termorresistentes e outras muito acima, não sendo destruídos em temperaturas inferiores a 100ºC.

Quadro 23.1. Valores D e z de diversos microrganismos de importância em alimentos.

	Temperatura (ºC)	Valor D (min)	Valor z (ºC)	Fonte[a]
Esporos de bactérias				
Geobacillus stearothermophilus	121,1	4,0 a 5,0	7,8 a 12,2	(4)
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum	121,1	3,0 a 4,0	8,9 a 12,2	(4)
Desulfotomaculum nigrificans	121,1	2,0 a 3,0	8,9 a 12,2	(4)
Clostridium sporogenes PA 3679	121,1	0,1 a 1,5	7,8 a 10,0	(4)
Clostridium botulinum tipos A e B	121,1	0,1 a 0,2	7,8 a 10,0	(4)
Bacillus coagulans	121,1	0,01 a 0,07	7,8 a 10,0	(4)
Alicyclobacillus acidocaldarius	120	0,1	7,0	(6)
Clostridium histolyticum	100	1,0	10,0	(2)
Clostridium pasteurianum	100	0,1 a 0,5	6,7 a 8,9	(4)
Costridium butyricum	100	0,1 a 0,5	-	(2)
Bacillus licheniformis	100	13,0	6,0	(2)
Bacillus cereus	100	5,0	10,0	(2)
Paenibacillus macerans	100	0,1 a 0,5	6,7 a 8,9	(4)
Paenibacillus polymyxa	100	0,1 a 0,5	6,7 a 8,9	(4)
Alicyclobacillus acidoterrestris	95	2,5 a 8,7	7,2 a 11,3	(5)
Sporolactobacillus inulinus	90	4,0 a 7,0	10,0 a 16,0	(1)
Esporos de bolores termorresistentes				
Byssochlamys fulva	90	1,0 a 12,0	6,0 a 7,0	(3)
Byssochlamys nivea	88	0,75 a 0,8	4,0 a 6,1	(3)
Células vegetativas				
Lactobacillus sp	65,6	0,5 a 1,0	4,4 a 5,6	(4)
Leuconostoc sp	65,6	0,5 a 1,0	4,4 a 5,6	(4)
Streptococcus pyogenes	65,6	0,2 a 2,0	4,4 a 6,7	(4)
Bolores e leveduras	65,6	0,5 a 1,0	4,4 a 5,6	(4)

[a] Fontes: (1) Banks (1989) (2) Ingram (1969), (3) Pitt & Hocking (1997), (4) Stumbo (1973), (5) Uboldi Eiroa *et al.*, 1999, (6) Palop *et al.* (2000).

Bactérias esporogênicas aeróbias termófilas estritas. São bactérias aeróbias que crescem bem em altas temperaturas (ótima na faixa dos 55ºC ou acima) e não crescem em temperaturas inferiores a 37ºC. A espécie típica desse grupo em alimentos é *Geobacillus stearothermophilus*, cujos esporos estão entre os mais resistentes ao calor ($D_{121,1ºC}$ = 4-5min). Aeróbio estrito ou anaeróbio facultativo, não cresce em condições ácidas (pH mínimo 5,5). *Alicyclobacillus acidocaldarius* também é termófilo estrito, mas sua presença em alimentos é menos comum. O valor $D_{120ºC}$ em água, tampão citrato-fosfato e suco de laranja é de 0,1min. É acidófilo e não cresce em pH neutro ou acima de 6,0.

Bactérias esporogênicas anaeróbias termófilas estritas. São bactérias anaeróbias que crescem bem em altas temperaturas (ótima na faixa dos 55ºC ou acima) e não crescem em temperaturas inferiores a 37ºC. As espécies típicas desse grupo em alimentos são *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ($D_{121,1ºC}$ = 3 a 4min, pH mínimo 4,7) e *Desulfotomaculum nigrificans* ($D_{121,1ºC}$ = 2 a 3min, pH mínimo 6,2), cujos esporos estão entre os mais resistentes ao calor e não crescem em condições ácidas.

Bactérias esporogênicas aeróbias termófilas facultativas. São bactérias aeróbias que crescem bem a 55ºC mas, ao contrário das termófilas estritas, crescem também abaixo de 37ºC. As espécies típicas desse grupo em alimentos são *Bacillus coagulans* e *Alicyclobacillus acidoterrestris*, cujos esporos são bem menos resistentes do que os da termófilas estritas. *B. coagulans* é anaeróbio facultativo e tem $D_{121,1ºC}$ entre 0,01 a 0,07min. Acidúrico, cresce bem em pH neutro ou levemente ácido (4,0 ou

acima). *A. acidoterrestris* tem $D_{95ºC}$ entre 2,5 e 8,7min e z entre 7,2 e 11,3ºC. É aeróbio, embora algumas cepas possam ser anaeróbias facultativas. Acidófilo, tem pH ótimo de 3,5 a 5,0 e geralmente não cresce em pH acima de 6,0.

Bactérias esporogênicas aeróbias mesófilas. O *Compendium* (Stevenson & Segner, 2001) define esse grupo como bactérias aeróbias que crescem melhor a 35 do que a 55ºC, porque algumas cepas são capazes de crescer em temperaturas acima de a 50ºC. As espécies típicas são dos gêneros *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. cereus*) e *Paenibacillus* (*P. macerans*, *P. polymyxa*), cujos esporos são menos resistentes do que os das bactérias termófilas. *Sporolactobacillus*, *Brevibacillus* e *Virgibacillus* também se encaixam nessa definição, mas sua associação com alimentos esterilizados é pouco documentada.

Bactérias esporogênicas mesófilas anaeróbias. As espécies típicas desse grupo são do gênero *Clostridium*. Os clostrídios proteolíticos (putrefativos) (*C. sporogenes*, *C. bifermentans*, *C. putrefasciens*, *C. hystolyticum* e *C. botulinum* tipos A e B) produzem esporos de maior resistência térmica. Os clostrídios não proteolíticos (sacarolíticos) (*C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii* e *C. acetobutylicum*), capazes de crescer em pH 4,2-4,4, produzem esporos pouco resistentes ao calor, comparados aos dos putrefativos.

23.1.3. DIMENSIONAMENTO DE PROCESSOS TÉRMICOS

As informações abaixo são de NCA (1968), Stumbo (1973) e Germer *et al.* (1995).

Dimensionamento de processos térmicos é o cálculo da letalidade (F), definida como o tempo (em minutos) necessário para destruir um determinado número de microrganismos, numa determinada temperatura de referência.

Esse cálculo seria muito simples se a esterilização de alimentos fosse feita à temperatura constante, da mesma forma como é determinado o valor D. Nessa situação, a suspensão de microrganismos atingiria a temperatura letal instantaneamente e, finalizado o tempo de exposição, seria resfriada também instantaneamente. Então, a letalidade seria o intervalo de tempo necessário para atingir um número de reduções decimais pré estabelecido, na propulação de um microrganismos alvo também pré estabelecido. Usando a Equação (1) da curva de sobrevivência, onde t (tempo em minutos) é chamado de F temos:

$$\mathbf{t = F = D\ Log(N_0/N_f)}$$

De acordo com essa equação, o tempo necessário para promover **n** reduções decimais na população alvo, ou seja, atingir uma população final $N_f = N_0/10^n$ seria: $F = D\ Log(N_0/N_0/10^n) = D\ Log10^n = nD$. Ou seja, para **n** reduções decimais, o tempo necessário é, simplesmente, **F = nD**.

Na prática, tratamentos a temperaturas constantes são raros, devido à inércia térmica dos materiais. Há um tempo de subida, até que o produto atinja a temperatura de tratamento, bem como um tempo de descida, até que o produto seja resfriado. Esse intervalo, em que a temperatura do produto está abaixo da temperatura de processo, também exerce um efeito letal e é considerado. Nesse caso, a letalidade é a soma do efeito letal de cada combinação tempo/temperatura por que passa o produto, determinado através do valor z. Os cálculos podem ser feitos de várias formas, descritas pela NCA (1968), Stumbo (1973) e Germer *et al.* (1995).

No final, o efeito destrutivo total deve ser equivalente à letalidade obtida através da curva de sobrevência, ou seja, equivalente ao tratamento à uma determinada temperatura de referência constante, aplicado para obter um determinado número de reduções decimais. Por isso, o valor F também é chamado de tempo equivalente à temperatura de referência e, quando a temperatura de referência é 121ºC e o valor z é de 10ºC, é chamado de F_0.

Definição da intensidade do processo térmico

Quanto maior o tempo e a temperatura de um processo térmico, mais intenso (mais letal) é o tratamento e menor é a chance de sobrevivência dos microrganismos. Entretanto, o tempo e a temperatura não podem ser elevados indiscriminadamente, porque isso comprometeria a qualidade nutricional e sensorial do alimento.

Para alimentos de baixa acidez, a temperatura de referência é 121,1ºC (aplicação de calor sob pressão) e os microrganismos considerados no dimensionamento do processo são *C. botulinum* e as outras bactérias esporogênicas.

Para *C. botulinum*, a intensidade deve ser suficiente para promover 12 reduções decimais na população dos esporos mais resistentes da espécie (tipos A e B). O valor $D_{121,1ºC}$ desses esporos é de 0,21min e o maior valor z determinado é de 10ºC. Então, o tempo equivalente à temperatura de referência (nesse caso F_0) é calculado como: $F_0 = nD = 12 \times 0,21 = 2,5$min. Isso significa que a letalidade do processo real, à temperatura não constante, deve ser equivalente a 2,5min a 121,1ºC.

Se considerarmos uma contaminação inicial de um esporo por embalagem (provavelmente segura, segundo Stumbo, 1973), a contaminação final seria $N_f = N_0/10^{12} = 1/10^{12} = 10^{-12}$. Esse valor de N_f é chamado de probabilidade de sobrevivência ou nível de garantia de esterilidade. O valor de 10^{-12} significa uma chance em 10^{12} (um trilhão) de restar uma embalagem com esporos viáveis ou, ainda, uma em cada 10^{12} embalagens poderia conter esporos viáveis depois do processamento.

Para outras bactérias esporogênicas mesófilas e termófilas facultativas, como não apresentam risco do ponto de vista da saúde pública, os fabricantes trabalham com probabilidade de sobrevivência ou nível de garantia de esterilidade de 10^{-5} (cinco reduções decimais) (Stumbo, 1973). Se considerarmos os maiores valores de $D_{121,1ºC}$ e z de *Clostridium sporogenes* (1,5min e 10ºC), que é uma das bactérias deteriorantes mais resistentes termicamente, o tempo equivalente para cinco reduções decimais é $F_0 = nD = 5 \times 1,5 = 7,5$min. Então, o processamento térmico de alimentos de baixa acidez é mais intenso do que o requerido para *C. botulinum*.

No caso de alimentos destinados à estocagem em temperaturas superiores a 40ºC ("vending machines"), as bactérias espororgênicas termófilas estritas devem ser consideradas. Segundo Stumbo (1973), a letalidade de vários processos utilizados nos Estados Unidos para esses alimentos é equivalente a 14-16min a 121,1ºC. Utilizando os maiores valores $D_{121,1ºC}$ e z de *G. stearothermophilus* (5min e 12,2ºC), que é uma das termófilas estritas mais resistentes termicamente, o número de reduções decimais desse tratamento, para essa bactéria, seria $n = F/D = 14\text{-}16/5 = 2,8$ a 3,2 reduções.

Para alimentos ácidos, a temperatura de referência é menor do que 100ºC e a aplicação de calor não é feita sob pressão. Não há, entretanto, uma temperatura pré estabelecida, sendo utilizada, para cada produto, aquela considerada letal para os microrganismos de maior resistência, dentre os que podem crescer.

23.1.4. DETERIORAÇÃO MICROBIANA DE ALIMENTOS ENLATADOS

A deterioração microbiana de alimentos enlatados não deve ser encarada como um problema comum, pois geralmente só acontece em decorrência de falhas na correta condução do processamento. As principais causas são:

Subprocessamento

Subprocessamento é a aplicação de calor em quantidade insuficiente para atingir a esterilidade comercial. Pode ser provocado por erro no dimensionamento do processo térmico; contaminação excessiva do produto antes da aplicação de calor (tornando o tratamento térmico

insuficiente); alterações na formulação do produto (com conseqüente efeito na transferência de calor); falha no funcionamento do equipamento; falha no controle do tempo/temperatura de esterilização.

Nos alimentos de baixa acidez, o subprocessamento é caracterizado pela sobrevivência de esporos de mesófilos ou termófilos facultativos. A deterioração anaeróbia por clostrídios putrefativos é a mais comum, caracterizada por odor pútrido. Esse tipo de deterioração tem sérias implicações, do ponto de vista de saúde pública, devido ao risco de presença de *C. botulinum* e suas toxinas.

Nos alimentos ácidos, a sobrevivência de esporos de bactérias mesófilas não é suficiente para caracterizar subprocessamento, porque o tratamento é mais brando. A sobrevivência de pequeno número de esporos de mesófilos não ácido-tolerantes é aceitável, uma vez que são incapazes de germinar e crescer no pH do produto. O subprocessamento, nesse caso, é caracterizado pela sobrevivência de esporos de bactérias ácido tolerantes e/ou esporos de bolores termorresistentes. São comuns os anaeróbios mesófilos butíricos, como *C. pasteurianum*, que produz ácido butírico (odor butírico), CO_2 e H_2 (estufamento). Também é comum o termófilo facultativo "flat-sour" *B. coagulans* (principalmente em produtos de tomate), que não provoca estufamento das embalagens. Os bolores termorresistentes mais comuns são *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fisheri* e *Talaromyces flavus*, que provocam descoloração, odor de mofo, presença de micélios e, eventualmente, ligeiro estufamento. No caso de subprocessamento grosseiro, também podem sobreviver células de bactérias não esporogênicas, bolores e leveduras. Nesse segundo caso, para caracterizar o subprocessamento como causa da deterioração, é necessário verificar a ausência de vazamento, porque culturas mistas de bactérias, bolores e leveduras também são características da deterioração por vazamento.

Vazamento

O termo vazamento é utilizado para expressar a recontaminação do produto depois do tratamento térmico. É decorrente da entrada de microrganismos ou de ar ou água contaminados, através da embalagem processada. Pode ocorrer por falha no sistema de fechamento das embalagens; utilização de embalagens defeituosas; manuseio inadequado das embalagens, com conseqüente dano nos selos ou costuras; resfriamento em água excessivamente contaminada. Nos alimentos produzidos pelo processo asséptico (produto e embalagem são esterilizados separadamente e o enchimento é feito em um ambiente asséptico), a recontaminação pode ocorrer no resfriamento (que é feito antes do acondicionamento), na área de enchimento, na área de fechamento ou mesmo, no enchimento de uma embalagem não estéril.

A deterioração por vazamento é caracterizada pela presença de uma microbiota mista, que pode conter tanto bactérias esporogênicas como bolores, leveduras e bactérias não esporogênicas (bastonetes, cocos, cocobacilos). Dependendo da microbiota predominante, pode haver ou não produção de gás (estufamento).

Deterioração por termófilos estritos

A deterioração por termófilos estritos ocorre quando o produto permanece por tempo prolongado a temperaturas elevadas, permitindo a germinação dos esporos que tenham sobrevivido ao processamento. Pode ser causada por resfriamento lento e/ou estocagem em temperaturas superiores a 37°C. Para caracterizar esse tipo de deterioração é necessário verificar se os esporos sobreviventes são de termófilos estritos ou facultativos. Para tanto deve-se isolar e purificar a cultura e, a partir da cultura pura, promover a produção de esporos, submeter a choque térmico e incubar

a 35 e 55°C, observando a temperatura de germinação. Esporos que germinem exclusivamente a 55°C são termófilos estritos, cuja sobrevivência em pequeno número é considerada normal em enlatados, se o produto não se destinar à estocagem em temperaturas acima de 37°C. Esporos que germinem tanto a 35 quanto a 55°C são termófilos facultativos e não devem sobreviver ao tratamento térmico.

As alterações mais comuns são: a) deterioração tipo "flat-sour", provocada por *G. stearothermophilus*, que resulta em redução do pH sem estufamento; b) deterioração anaeróbia sem produção de H_2S, provocada por *T. thermosaccharolyticum*, que resulta em odor de queijo e pronunciado estufamento das embalagens; c) deterioração termófila anaeróbia com produção de H_2S, provocada por *D. nigrificans*, que resulta no escurecimento do conteúdo (reação do H_2S com o ferro), sem estufamento das embalagens.

Multiplicação microbiana antes do tratamento térmico

A permanência do produto formulado por períodos prolongados, antes da esterilização, pode permitir a multiplicação de microrganismos, resultando num processo incipiente de deterioração. Esse processo será interrompido pelo tratamento térmico, porém, as alterações já introduzidas não serão revertidas, resultando em produtos alterados, com um grande número de células mortas e, em alguns casos, com as embalagens sem vácuo ou levemente estufadas, pelo acúmulo de CO_2.

Causas não-microbianas de deterioração

Nem sempre a deterioração de alimentos enlatados tem origem microbiana, podendo ser provocada por outras causas como: a) Interação química entre o alimento e a embalagem, que ocorre principalmente entre os ácidos dos alimentos e o metal das embalagens. Provoca corrosão com produção e acúmulo de gás hidrogênio (estufamento). Em estágios avançados podem ser observados microfuros nas latas ou nas tampas de embalagens de vidro. b) Reações enzimáticas, que ocorrem principalmente em alimentos produzidos pelo processo asséptico, tratados com altas temperaturas por curto tempo (UHT ou HTST). Resultam da não inativação ou da regeneração de enzimas constituintes do alimento, podendo provocar alterações como liquefação, coagulação, descoloração ou odores estranhos. Esse tipo de deterioração não apresenta risco de saúde, não provoca alterações na embalagem e geralmente é caracterizado pela presença de número reduzido de células microbianas, na observação mitcroscópica direta do produto.

23.2. TESTE DE ESTERILIDADE COMERCIAL DETERMINAÇÃO DA CAUSA DA DETERIORAÇÃO ALIMENTOS DE BAIXA ACIDEZ

Método da American Public Health Association (APHA), descrito nos Capítulos 61 e 62 da 4° Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Deibel & Jantschke, 2001, Denny & Parkinson, 2001).

Observações

O *Compendium* diferencia o teste de esterilidade comercial (capítulo 61) do teste de causa da deterioração (capítulo 62) o que não foi feito nesse manual. A utilização do mesmo procedimento para os dois testes é baseada em várias outras referências, como o *Bacteriological*

Analytical Manual (*BAM Online*) da Food and Drug Administration (Landry *et al.*, 2001) e o *Compendium of Analytical Methods* do Governo do Canada, Health Products and Food Branch (MFHPB, 2001). No *Compendium*, os dois testes usam, basicamente, o mesmo procedimento, variando os meios de cultura. Na verdade, o próprio capítulo 61 do *Compendium* (item 61.54) coloca a possibilidade de usar o mesmo procedimento para os dois testes, ao deixar em aberto as opções de meios de inoculação para o teste de esterilidade comercial. Esses meios podem ser o próprio alimento (em condição normal e esterilizado antes do uso) ou outros meios adequados para enlatados, escolhidos em seu capítulo 63 (preparo de meios e reagentes). Nesse capítulo estão contemplados os meios citados no capítulo 62 e, também, os utilizados nos métodos do BAM Online e do *Compendium of Analytical Methods* do Governo do Canada.

No método descrito abaixo, a inoculação das amostras é feita em tubos com meio de cultura líquido. O *Compendium* também coloca possibilidade de fazer algumas inoculações diretamente em placas: Os quatro tubos de caldo BCP ou DTB podem ser substituídos por quatro placas de Ágar Dextrose Triptona (DTA). Nesse caso, inocular uma alçada da amostra em cada placa, por estrias de esgotamento ou, se o produto for líquido, fazer o plaqueamento em profundidade (1ml sem diluição). A incubação é feita nas mesmas condições indicadas para os tubos.

23.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Tubos de Caldo de Fígado (CF), Meio de Carne Cozida (CMM) ou Meio PE-2
- Placas de Ágar Fígado de Vitela (LVA) ou Meio Reforçado para Clostrídios (RCM)
- Tubos de Caldo Dextrose Púrpura de Bromocresol (BCP) ou Caldo Dextrose Triptona (DTB)
- Placas de Ágar Nutriente Manganês (ANMn)
- Ágar Selo (Ágar 2%) ou Vaspar (vaselina:parafina 1:1)
- Reagentes para coloração de Gram
- Reagentes para coloração de esporos
- Solução de álcool iodado
- Abridor de latas bacteriológico esterilizado
- Tesouras, pinças, espátulas, estiletes esterilizados
- Equipamento ou sistema de geração de atmosfera anaeróbia
- Estufa incubadora regulada a 30 ou 35°C
- Estufa incubadora regulada a 55°C

23.2.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise para o teste de esterilidade comercial ou causa da deterioração de alimentos de baixa acidez encontra-se descrito na Figura 23.3.

Advertência

Todas as etapas do ensaio de alimentos de baixa acidez envolvem o risco de presença de *Clostridium botulinum* e suas toxinas. Em função disso, o teste deve ser conduzido apenas por técnicos bem treinados, particularmente no caso de amostras alteradas (estufadas, com vazamento ou com perda de vácuo).

a) Cuidados para prevenir a contaminação do analista e do laboratório

Todas as etapas da análise devem ser realizadas com toucas, luvas, máscara e óculos protetores.

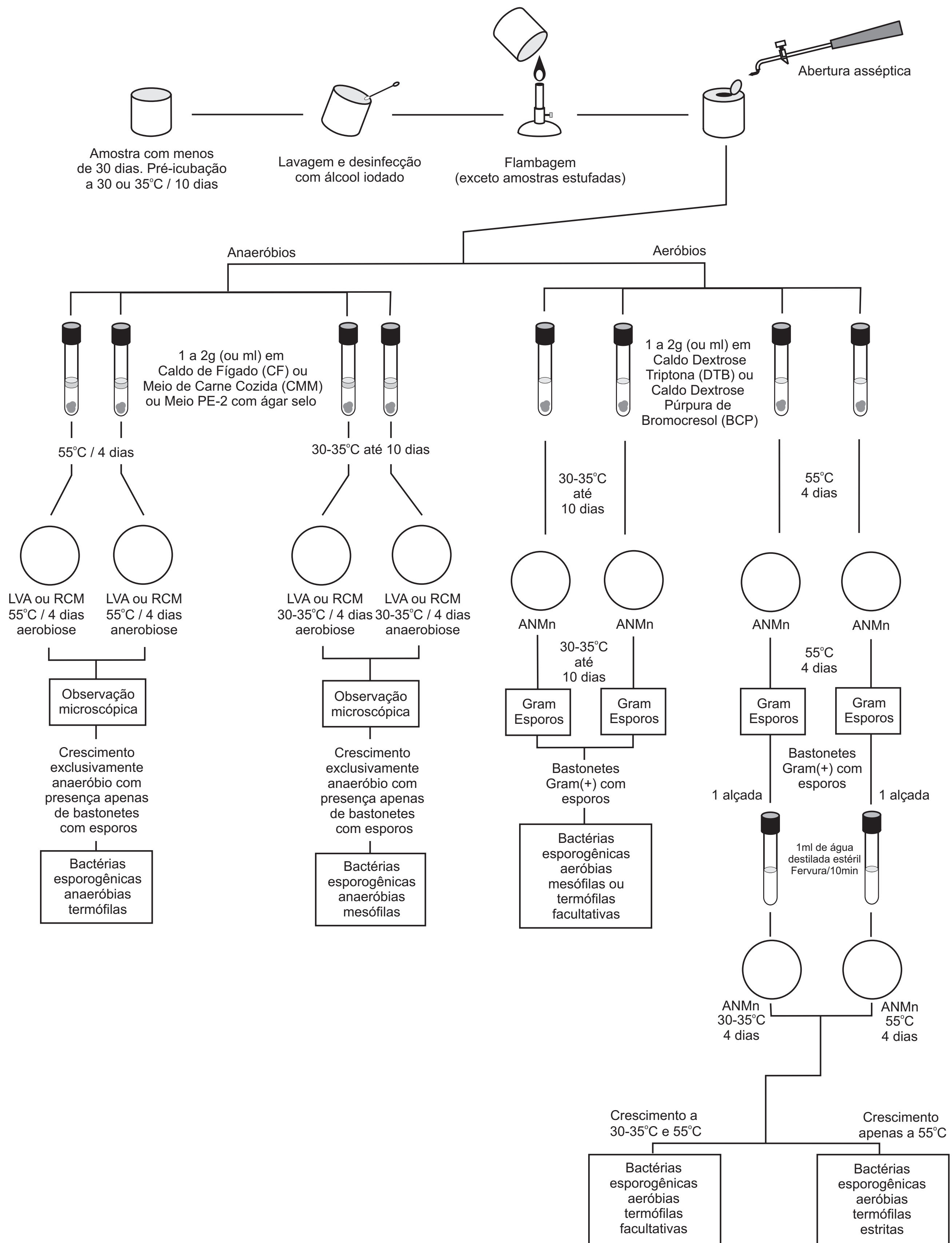


Figura 23.3. Esquema de análise para o teste de esterilidade comercial ou causa da deterioração de alimentos de baixa acidez.

O ensaio deve ser conduzido em capela de fluxo laminar vertical, que protege tanto o analista quanto a amostra contra contaminação.

Todo o manuseio deve ser feito sobre bandejas e não diretamente sobre as bancadas.

Nenhuma coleta de líquido com pipeta deve ser feita com a boca e sim com pipetadores.

Manter ao alcance das mãos um frasco de solução saturada de bicarbonato de sódio, para inativação imediata de toxinas botulínicas, no caso de uma descarga acidental de material potencialmente tóxico.

b) Cuidados para evitar a contaminação acidental da amostra no laboratório

A contaminação acidental das amostras no laboratório é particularmente problemática no caso de teste de esterilidade comercial, porque o objetivo primordial do ensaio é demonstrar a ausência de microrganismos viáveis na amostra. Para garantir a confiabilidade dos resultados, devem ser criteriosamente observados os seguintes cuidados:

Além de conduzir o teste em câmara de fluxo laminar vertical, o equipamento deve ser descontaminado e mantido em operação por uma hora, antes do uso.

A esterilidade dos meios de cultura deve ser verificada antes do início das análises. Para tanto, incubar uma amostra de cada meio de cultura, de cada batelada preparada, nas mesmas condições que serão utilizadas na análise.

Todos os frascos e tubos, vazios ou contendo meios de cultura, devem ser de tampa rosqueável, que protege a boca contra contaminação ambiental. Alternativamente, cobrir os tampões e a boca dos frascos e tubos com uma folha dupla de alumínio.

Todos os utensílios destinados ao teste (espátulas, colheres, pinças, abridores de lata, etc.) devem ser previamente esterilizados em embrulhos individuais, identificando-se a extremidade que deve ser aberta. Em autoclave, a esterilização deve ser feita a 121°C/30min. Em estufa de esterilização, deve ser feita a 170-180°C/2h. A prática de flambagem com álcool não é recomendada, nesse caso, porque não elimina esporos.

Antes de iniciar as análises, lavar as mãos com água e sabão e descontaminar com solução de álcool 70%. Substituir o avental usado por um avental limpo. Prender os cabelos antes de colocar a touca. Se estiver resfriado ou com tosse, não conduzir esse ensaio.

c) Manutenção e pré-incubação das amostras antes da análise

c.1) Amostras normais recém processadas. Amostra de alimentos recém-processados (com menos de 30 dias desde a fabricação) devem ser pré-incubadas a 30-35°C por dez dias, antes da análise. Amostras destinadas à estocagem em temperatura superior a 40ºC (“hot vending”) também devem ser incubadas a 55ºC por cinco a sete dias. A pré incubação objetiva verificar a ocorrência de possíveis alterações, como estufamento e/ou vazamento e/ou modificação nas características sensoriais (cor, odor, textura, viscosidade, etc.). Sendo evidenciada qualquer alteração, observar os cuidados recomendados ao longo do texto para amostras alteradas.

c.2) Amostras normais com mais de 30 dias de fabricação. Essas amostras não precisam ser pré-incubadas, podendo ser analisadas imediatamente ou estocadas à temperatura ambiente até o momento da análise.

c.3) Amostras alteradas. Amostras estufadas, com vazamento ou com suspeita de microrganismos patogênicos não devem ser pré-incubadas. Acondicionar a embalagem em uma bolsa plástica resistente e manter sob refrigeração até o momento da análise. Se a embalagem estiver aberta, é recomendável transferir o conteúdo para um frasco estéril. No caso da suspeita de presença de *T. thermosaccharolyticum*, entretanto, não é recomendável refrigerar as amostras, porque as células vegetativas dessas bactérias geralmente morrem sob refrigeração e não é usual a formação de esporos em enlatados (Ashton & Bernard, 2001).

d) Abertura asséptica das embalagens

d.1) Amostras normais. Lavar as embalagens com sabão ou detergente, enxáguar em água corrente e secar com papel toalha. Desinfetar a parte onde será feita a abertura com solução de álcool iodado, flambando até a completa combustão. Embalagens que não resistem à combustão devem permanecer em contato com o álcool iodado por pelo menos 15 minutos, para garantir a desinfecção.

A abertura de latas deve ser feita pelo fundo, com o auxílio de um abridor de latas do tipo bacteriológico esterilizado (Figura 23.4), que não danifica a recravação. Latas do tipo "easy open" também devem ser abertas pelo fundo, da mesma forma utilizada para as latas convencionais, garantindo-se a integridade do sistema de abertura. Embalagens de vidro podem ser abertas aplicando-se o abridor de latas bacteriológico à tampa, com o devido cuidado para não deslocar a tampa de sua posição em relação ao corpo. Havendo necessidade de remover completamente a tampa, a remoção pode ser facilitada, se for feito um furo no centro (com o abridor de latas bacteriológico), para aliviar o vácuo. Embalagens flexíveis podem ser cortadas com uma tesoura estéril, removendo-se uma das extremidades, abaixo do ponto de selagem, porém, sem danificar o selo, que deve ser guardado para análises físicas posteriores, se necessárias.

d.2) Amostras alteradas. Antes da abertura, observar e anotar as condições da embalagem, como estufamento leve ou pronunciado, evidência de vazamento, corrosão, etc. Resfriar as embalagens estufadas, para reduzir o risco de explosão ou escape descontrolado dos gases durante a abertura.

Lavar as embalagens com escova e detergente, desinfetar a parte onde será feita a abertura com álcool iodado e manter o contato com o álcool iodado por pelo menos 15 minutos. Remover o excesso com um chumaço de algodão estéril ou aguardar a secagem na capela de fluxo laminar. Não flambar as embalagens estufadas pois há risco de explosão.

A abertura das embalagens não-estufadas pode ser feita da mesma forma recomendada para amostras normais. No caso das embalagens estufadas, são necessários cuidados adicionais para evitar o escape descontrolado dos gases ou do conteúdo. Uma das formas de prevenir esse

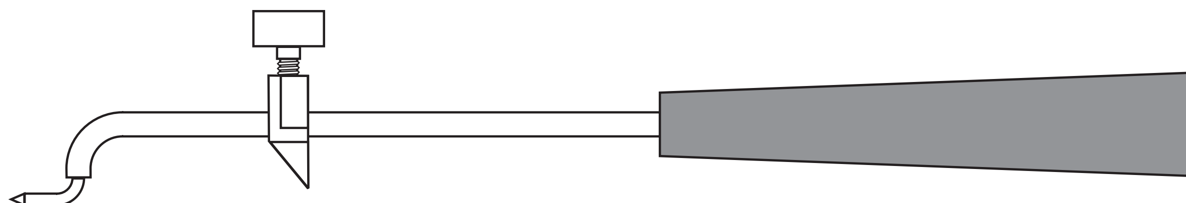


Figura 23.4. Abridor de latas bacteriológico para a abertura de latas no teste de esterilidade comercial.

problema é colocar um funil estéril invertido sobre a região da abertura e, passando-se um estilete através do funil, furar a embalagem para aliviar a pressão interna. Alternativamente, em lugar do funil invertido pode-se utilizar uma toalha ou um chumaço de algodão estéril sobre a região da abertura. Depois do escape dos gases, a abertura pode ser continuada da mesma forma recomendada para embalagens normais.

e) Inoculação

Homogeneizar o conteúdo da embalagem e, antes da inoculação, retirar 50g ou 50ml da amostra e transferir para frascos estéreis com tampas rosqueáveis. Conservar essa porção sob refrigeração, como contra-amostra. Inocular 1-2g ou ml da amostra nos meios abaixo. Os tubos de CF, CMM ou PE-2 devem ser desaerados antes da inoculação e, após a inoculação, cobertos com Ágar Selo ou Vaspar.

Caldo de Fígado (CF), Meio de Carne Cozida (CMM) ou meio PE-2 (com ágar selo)	4 tubos
Caldo Dextrose Púrpura de Bromocresol (BCP) ou Caldo Dextrose Triptona (DTB)	4 tubos

f) Incubação

Incubar os tubos nas condições abaixo. Se o produto não se destinar à estocagem em temperatura acima de 37°C, os tubos incubados 55°C podem ser omitidos.

Meio	Nº de tubos	Temperatura/tempo de incubação	Atmosfera	Microbiota alvo
CF/CMM/PE-2 com ágar selo	2 tubos	30 ou 35ºC / até 10 dias	normal	Bactérias esporogênicas mesófilas anaeróbias
CF/CMM/PE-2 com ágar selo	2 tubos	55ºC / 4 dias	normal	Bactérias esporogênicas termófilas anaeróbias
DTB/BCP	2 tubos	30 ou 35ºC / até 10 dias	normal	Bactérias esporogênicas mesófilas aeróbias
DTB/BCP	2 tubos	55ºC / 4 dias	normal	Bactérias esporogênicas termófilas aeróbias

g) Caracterização dos microrganismos isolados em CF/CMM/PE-2

Havendo crescimento nos tubos, submeter as culturas à caracterização. Em caso de dúvidas sobre o desenvolvimento de microrganismos (crescimento duvidoso), continuar o ensaio normalmente e, não havendo crescimento nas subculturas, considerar que não houve crescimento no tubo original.

Cuidado na manipulação dos tubos incubados a 30 ou 35°C, devido à potencial presença de *Clostridium botulinum* e suas toxinas. Apenas técnicos bem treinados devem trabalhar com essas culturas.

Para verificar se a cultura é anaeróbia estrita ou facultativa, inocular uma alçada de cada tubo em duas placas de Ágar Fígado de Vitela (LVA) ou Meio Reforçado para Clostrídios (RCM), por estrias de esgotamento. De cada par de placas, incubar uma sob condições anaeróbias e uma sob condições aeróbias, por quatro dias, na mesma temperatura do tubo original. Crescimento exclusivo na placa anaeróbia indica cultura anaeróbia estrita. Crescimento nas duas placas (aeróbia e anaeróbia) indica cultura anaeróbia facultativa ou mistura de anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos.

Para a caracterização da morfologia das células, preparar uma montagem úmida da cultura obtida em cada placa, para observação microscópica a fresco (procedimento descrito no Capítulo 5). Selecionar uma colônia de cada tipo presente nas placas, para a caracterização. Observar o(s) tipo(s) morfológico(s) das células, que podem ser bastonetes, cocos, cocobacilos, leveduras ou bolores. Havendo culturas de bastonetes, anotar se há formação de esporos.

h) Caracterização dos microrganismos isolados em DTB/BCP

Havendo crescimento nos tubos de DTB ou BCP, submeter as culturas à caracterização. Em caso de dúvidas sobre o desenvolvimento de microrganismos (crescimento duvidoso), continuar o ensaio normalmente e, não havendo crescimento nas subculturas, considerar que não houve crescimento no tubo original.

Para verificar a formação de esporos e a morfologia das células, inocular cada cultura obtida nos tubos de DTB ou BCP em Ágar Nutriente Manganês (ANMn). Incubar as placas por até dez dias, na mesma temperatura do tubo original. Após a incubação, selecionar uma colônia de cada tipo presente nas placas, para a caracterização morfológica. Submeter as culturas à coloração de esporos e à coloração de Gram, conforme procedimentos descritos no Capítulo 5. Havendo formação de esporos nas placas incubadas a 55°C, verificar se a cultura é termófila estrita ou facultativa.

Para verificar se a cultura é termófila estrita ou facultativa, transferir duas alçadas da cultura obtida nas placas de ANMn a 55°C para 1ml de água destilada estéril, submeter a choque térmico por 10min sob fervura. Resfriar imediatamente em banho de gelo e estriar o material em duas novas placas de ANMn. Incubar uma placa a 35°C/4 dias e uma placa a 55°C/4 dias. Observar a temperatura em que ocorre germinação e crescimento dos esporos. Crescimento a 35 e 55°C indica termófilos facultativos. Crescimento apenas a 55°C indica termófilos estritos.

i) Descarte das amostras e guarda das embalagens

Esterilizar o conteúdo restante da amostra nas embalagens a 121ºC/30min e descartar. Lavar e guardar as embalagens, para análises físicas posteriores, se necessárias.

23.2.3. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A interpretação depende da ocorrência ou não de crescimento, em que meios e condições de incubação ocorreu o crescimento e se a amostra apresentou ou não evidência de alteração.

a) Ausência de crescimento

Em amostras normais, sem evidência de alteração, a ausência de crescimento em qualquer dos tubos inoculados indica produto comercialmente estéril.

Em amostras alteradas, a ausência de crescimento em qualquer dos tubos inoculados pode indicar causas não microbianas da alteração ou perda da viabilidade da cultura depois do crescimento e alteração do produto. Isso não é incomum, por exemplo, com anaeróbios termófilos ou com bactérias lácticas.

b) Crescimento

Em amostras aparentemente normais, sem evidência de alteração, a ocorrência de crescimento em um ou mais tubos pode indicar contaminação acidental. São suspeitas de contaminação acidental as seguintes situações: a) Crescimento em apenas um tubo da duplicata. b) Microbiota com características diferentes em cada tubo da duplicata. c) Crescimento anaeróbio

com produção de gás a 30-35°C, quando a amostra não apresentou qualquer problema de estufamento ou perda de vácuo na pré-incubação. d) Fazendo uma observação microscópica direta da amostra, encontrar tipos morfológicos diferentes dos encontrados nas culturas. Nesses casos, repetir o ensaio com a contra-prova armazenada, observando criteriosamente os cuidados para evitar a contaminação acidental da amostra no laboratório. Não havendo indicação de contaminação acidental, interpretar os resultados conforme orientação do Quadro 23.2 e itens abaixo:

Em amostras alteradas, a ocorrência de crescimento é esperada. Interpretar os resultados conforme orientação do Quadro 23.2 e itens abaixo:

c) Crescimento em CF, CMM ou PE-2 → LVA ou RCM a 30-35°C

A incubação do CF, CMM ou PE-2 a 30-35°C objetiva verificar a presença de bactérias esporogênicas anaeróbias mesófilas (clostrídios mesófilos, incluindo *C. botulinum*). Entretanto, diversos outros microrganismos podem crescer nessas condições:

c.1) Microbiota mista. O crescimento de microbiota mista com diferentes tipos morfológicos (bastonetes, cocos, cocobacilos, leveduras, bolores) revela a presença de um ou mais grupos microbianos não esporogênicos, que não podem resistir ao processamento térmico de produtos de baixa acidez. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento.

c.2) Cultura não esporogênica. O crescimento de apenas um tipo morfológico de microrganismo não esporogênico (só bolores, só leveduras, só cocos ou só cocobacilos), revela a presença de microbiota não resistente ao processamento térmico de produtos de baixa acidez. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento.

c.3) Cultura só de bastonetes. A interpretação depende da produção de esporos e do requerimento de oxigênio para crescimento (observada nas placas de LVA ou RCM incubadas a 30-35°C em condições aeróbias e anaeróbias).

c.3.1) Crescimento exclusivamente anaeróbio com formação de esporos. Revela a presença de bactérias mesófilas anaeróbias esporogênicas (clostrídios), cujos esporos não devem sobreviver ao processamento térmico de produtos de baixa acidez. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável subprocessamento. Potencial presença de *C. botulinum*, particularmente se houver odor pútrido. Verificar presença de toxinas botulínicas.

c.3.2) Crescimento exclusivamente anaeróbio sem formação de esporos. Revela a presença de bactérias anaeróbias não esporogênicas ou de bactérias mesófilas anaeróbias esporogênicas (clostrídios), que não esporulam facilmente em meios de cultura. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento ou subprocessamento. É recomendável testar outros meios de esporulação e verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

c.3.3) Crescimento aeróbio e anaeróbio. Revela a presença de anaeróbios facultativos ou mistura de anaeróbios estritos e facultativos. No segundo caso, os anaeróbios facultativos provavelmente também serão detectados no DTB ou BCP. Indica produto não comercialmente estéril, causa provável subprocessamento. Se não houver esporos podem ser lactobacilos, indicando vazamento ou clostrídios que não esporulam facilmente em meios de cultura, indicando subprocessamento. É recomendável testar outros meios de

esporulação e verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

d) Crescimento em CF, CMM ou PE-2 → LVA ou RCM a 55ºC

A incubação do PE-2 ou CMM a 55ºC objetiva verificar a presença de bactérias esporogênicas anaeróbias termófilas. A observação de bastonetes indica a presença desse grupo de microrganismos, que podem ser confirmados pelo teste de requerimento de oxigênio para crescimento, nas placas de LVA ou RCM incubadas a 55ºC em condições aeróbias e anaeróbias.

d.1) Crescimento exclusivamente anaeróbio. Confirma a presença de termófilos anaeróbios estritos, cujos esporos são altamente resistentes ao calor e cuja sobrevivência, em pequeno número, é considerada normal nos alimentos enlatados. Se o produto não apresentar evidência de alteração e não se destinar à estocagem em temperaturas elevadas, pode ser considerado comercialmente estéril. Se o produto estiver alterado, a presença desse grupo indica provável deterioração por resfriamento lento e/ou estocagem em temperaturas elevadas.

Quadro 23.2. Interpretação dos resultados da determinação da causa da deterioração em alimentos de baixa acidez.

Condição da lata	Odor	Aparência do produto	pH do produto	Exame microscópico	Cultura	Diagnóstico
Estufada com corrosão interna	Normal (metálico)	Normal ou espumosa	Normal	Negativo	Negativa	Corrosão: deve –se confirmar a presença de H_2 (mais de 20%)
Estufada	Ácido	Espumosa ou salmoura viscosa	Abaixo do normal	Cultura pura ou mista de bastonete, cocos ou leveduras	Crescimento aeróbio e/ou anaeróbio a 35°C e, possivelmente, a 55°C	Vazamento ou subprocessamento grosseiro
Estufada	Normal ou ácido "de queijo"	Espumosa	Normal ou ligeiramente abaixo	Bastonetes médio curtos ou médio longos, usualmente com aspecto granular, esporos raramente presentes	Gás em anaerobiose a 55°C e, possivelmente, a 35°C. Cultura negativa, provavelmente devido à auto-esterilização	Resfriamento inadequado ou estocagem à temperatura elevada (termófilos anaeróbios)
Estufada ou não e sem vácuo	Normal, ácido "de queijo" ou pútrido	Normal ou espumosa com desintegração de partículas sólidas	Normal ou ligeiramente abaixo	Bastonetes, possivelmente com esporos presente	Gás em condições anaeróbias a 35°C. Odor pútrido	Subprocessamento (mesófilos anaeróbios possibilidade de *C.botulinum*)
Estufada ou não e sem vácuo	Levemente anormal, possivelmente amoniacal	Normal ou espumosa	Pouco ou bastante abaixo do normal	Bastonetes, ocasionalmente com esporos presentes	Crescimento aeróbio e/ou anaeróbio com gás a 35°C, e, possivelmente, a 55°C. Película na superfície do caldo BCP. Formação de esporos em ANMn. Catalase (+)	Subprocessamento ou vazamento, mesófilos aeróbios ou anaeróbios facultativos (*Bacillus* ou gêneros relacionados)
Estufada ou não e sem vácuo	Butírico	Espumosa, com bastantes gás	Bastante abaixo do normal	Bastonetes, coloração bipolar, prováveis esporos	Gás em condições anaeróbias a 35°C. Odor butírico	Subprocessamento. Anaeróbios do grupo butírico
Normal, com ou sem vácuo	Ácido	Normal ou salmoura viscosa	Pouco ou bastante abaixo do normal	Bastonetes, usualmente com aspecto granular	Crescimento com ácido e sem gás a 55°C e, possivelmente, a 35°C. Catalase (+)	Resfriamento inadequado ou estocagem à temperatura elevada. Termófilos "flat sour"
Normal, com ou sem vácuo	Normal ou ácido	Normal ou salmoura viscosa	Pouco ou bastante abaixo do normal	Cultura pura ou mista de bastonetes, cocos ou bolores	Crescimento aeróbio e/ou anaeróbio a 35°C e, possivelmente, a 55°C	Vazamento ou subprocessamento grosseiro. Bolores presentes: vazamento.
Sem vácuo e/ou deformada	Normal	Normal	Normal ou levemente abaixo	Negativo ou microrganismos escassos	Negativa	Exaustão insuficiente. Branqueamento insuficiente. Resfriamento inadequado. Sobre-enchimento. Deterioração insipiente.

d.2) Crescimento aeróbio e anaeróbio. Revela a presença de termófilos anaeróbios facultativos, cujos esporos são altamente resistentes ao calor e cuja sobrevivência, em pequeno número, também é considerada normal nos alimentos enlatados. Pode ainda indicar mistura de termófilos anaeróbios estritos e facultativos. Se o produto não apresentar evidência de alteração e não se destinar à estocagem em temperaturas elevadas, pode ser considerado comercialmente estéril. Se o produto estiver alterado, a presença desse grupo indica provável deterioração por resfriamento lento e/ou estocagem em temperaturas elevadas.

e) Crescimento em BCP ou DTB → ANMn a 30-35°C

A incubação do BCP ou DTB a 30-35°C objetiva verificar a presença de mesófilos aeróbios esporogênicos. A observação de bastonetes esporogênicos indica a presença desse grupo, mas outros grupos de microrganismos também podem crescer.

e.1) Microbiota mista. O crescimento de microbiota mista com diferentes tipos morfológicos (bastonetes, cocos, cocobacilos, leveduras, bolores) revela a presença de um ou mais grupos microbianos que não são formadores de esporos e não resistem ao processamento térmico de produtos de baixa acidez. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento. Verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

e.2) Cultura pura não esporogênica. O crescimento de apenas um tipo morfológico de microrganismo que não forma esporos (só bolores, só leveduras, só cocos ou só cocobacilos), revela a presença de microbiota não resistente ao processamento térmico de produtos de baixa acidez. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento. Verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

e.3) Cultura pura só de bastonetes. A interpretação depende da produção de esporos em ANMn a 30-35°C.

e.3.1) Esporos ausentes. Revela presença de aeróbios mesófilos não espororgênicos, não resistente ao processamento térmico de produtos de baixa acidez. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento. Verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

e.3.2) Esporos presentes. Revela presença de aeróbios mesófilos esporogênicos, cujos esporos não devem sobreviver ao processamento térmico de produtos de baixa acidez. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável subprocessamento.

f) Crescimento em BCP ou DTB → ANMn a 55°C

A incubação do BCP ou DTB a 55°C objetiva verificar a presença de bacilos termófilos estritos. A observação de bastonetes com esporos aponta para esse grupo, mas a confirmação depende da temperatura de germinação dos esporos e crescimento da cultura.

f.1) Germinação e crescimento apenas a 55°C. Confirma a presença de aeróbios termófilos estritos. Produção de ácido no tubo original de BCP ou DTB (mudança da coloração do meio para amarelo) indica aeróbios termófilos tipo “flat-sour”. Os esporos aeróbios termófilos estritos são altamente resistentes ao calor e sua sobrevivência, em pequeno número, é considerada normal nos alimentos enlatados. Se o produto não apresentar

evidência de alteração e não se destinar à estocagem em temperaturas elevadas, pode ser considerado comercialmente estéril. Se o produto estiver alterado, a presença desse grupo indica provável deterioração por resfriamento lento e/ou estocagem em temperaturas elevadas.

f.2) Germinação e crescimento a 55°C e 30-35°C. Confirma a presença de aeróbios termófilos facultativos, cujos esporos não devem sobreviver ao processamento térmico de produtos de baixa acidez. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável subprocessamento.

23.3. TESTE DE ESTERILIDADE COMERCIAL DETERMINAÇÃO DA CAUSA DA DETERIORAÇÃO ALIMENTOS ÁCIDOS

Método da American Public Health Association (APHA), descrito nos Capítulos 61 e 62 da 4º Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Deibel & Jantschke, 2001, Denny & Parkinson, 2001).

Observações

O *Compendium* diferencia o teste de esterilidade comercial (capítulo 61) do teste de causa da deterioração (capítulo 62) o que não foi feito nesse manual. A utilização do mesmo procedimento para os dois testes é baseada em várias outras referências, como o do *Bacteriological Analytical Manual* (*BAM Online*) da Food and Drug Administration (Landry *et al.*, 2001) e o *Compendium of Analytical Methods* do Governo do Canada, Health Products and Food Branch (MFHPB, 2001). No *Compendium*, os dois testes usam, basicamente, o mesmo procedimento, variando os meios de cultura. Na verdade, o próprio capítulo 61 do *Compendium* (item 61.54) coloca a possibilidade de usar o mesmo procedimento para os dois testes, ao deixar em aberto as opções de meios de inoculação para o teste de esterilidade comercial. Esses meios podem ser o próprio alimento (em condição normal e esterilizado antes do uso) ou outros meios adequados para enlatados, escolhidos em seu capítulo 63 (preparo de meios e reagentes). Nesse capítulo estão contemplados todos os meios citados no capítulo 62 e, também, os utilizados nos métodos do BAM Online e do *Compendium of Analytical Methods* do Governo do Canadá.

No método descrito abaixo, a inoculação das amostras é feita em tubos com meio de cultura líquido. O *Compendium* também coloca possibilidade de fazer algumas inoculações diretamente em placas: Os quatro tubos de caldo TAB podem ser substituídos por seis placas Ágar Thermoacidurans (TAA), duas incubadas a 30 ou 35°C/2 a 5 dias em condições aeróbias, duas a 30 ou 35°C/2 a 5 dias em condições anaeróbias e duas a 55°C/2 a 5 dias em condições aeróbias. Os dois tubos de EM podem ser substituídos por duas placas de Ágar Batata Dextrose acidificado (PDA), incubados a 25 ou 30°C/2 a 5 dias. Os dois tubos de APT, MRS ou OSB podem ser substituídos por duas placas de Ágar APT, MRS ou OSA, incubadas a 30°C/2 a 5 dias. Os dois tubos de Caldo ALI podem ser substituídos por duas placas de Ágar K, incubadas a 43°C/2 a 5 dias. Em todos esses casos, inocular uma alçada da amostra em cada placa, por estrias de esgotamento ou, se o produto for líquido, fazer o plaqueamento em profundidade (1ml sem diluição).

23.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Tubos de Caldo Thermoacidurans (TAB), também chamado de Caldo Ácido (CA)
- Placas de Ágar Thermoacidurans (TAA)
- Tubos de Caldo Extrato de Malte (EM)
- Placas de Ágar Batata Dextrose (PDA) acidificado
- Tubos de Caldo All Purpose Tween (APT), Caldo De Man Rogosa & Sharpe (MRS) ou Caldo Soro de Laranja (OSB) (opcional)
- Placas de Ágar All Purpose Tween (APT), Ágar De Man Rogosa & Sharpe (MRS) ou Ágar Soro de Laranja (OSA) (opcional)
- Placas de Ágar Dextrose Triptona (DTA)
- Placas de Ágar Batata Dextrose (PDA) com antibióticos ou Ágar Extrato de Malte (MEA) com antibióticos
- Ágar Selo ou Vaspar (Vaselina:Parafina 1:1)
- Reagentes para coloração de Gram
- Solução de álcool iodado
- Abridor de latas bacteriológico esterilizado
- Tesouras, pinças, espátulas, estiletes esterilizados
- Estufa incubadora regulada a 30°C
- Estufa incubadora regulada a 35°C
- Estufa incubadora regulada a 55°C

23.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema de análise para o teste de esterilidade comercial ou causa da deterioração de alimentos ácidos encontra-se descrito na Figura 23.5.

a) Cuidados para evitar a contaminação acidental da amostra no laboratório

Seguir as mesmas orientações do teste para alimentos de baixa acidez.

b) Preparação dos meios de cultura

O *Compendium* da APHA (Deibel & Jantschke, 2001) recomenda que todos os meios usados no teste de esterilidade comercial de alimentos ácido sejam ácidos, porque apenas microrganismos capazes de crescer em condições ácidas são relevantes nesses produtos. O *Compendium* do Canada (MFHPB, 2001) é mais explicito, recomendando que o pH dos meios seja ajustado no valor de pH do produto. Na rotina dos laboratórios, em que os meios são preparados com antecedência, pode ser difícil aguardar a chegada dos produtos, para então ajustar o pH dos meios. Nesse caso, uma alternativa viável, é preparar os meios com o pH ajustado no limite que separa alimentos ácidos de alimentos de baixa acidez (4,6). No caso dos meios que, normalmente, já têm o pH abaixo desse valor, deve ser mantido o pH original.

c) Manutenção e pré-incubação das amostras antes da análise

Para as amostra de alimentos recém-processados (com menos de 30 dias desde a fabricação), pré-incubar a 25-30°C por dez dias, antes da análise. Para amostras destinadas à estocagem em temperatura superior a 40ºC (“hot vending”) incubar também a 55ºC por cinco a sete dias. Para as demais amostras, seguir as mesmas orientações do teste para alimentos de baixa acidez.

d) Abertura asséptica das embalagens

Seguir as mesmas orientações do teste para alimentos de baixa acidez.

e) Inoculação

Homogeneizar o conteúdo da embalagem e, antes da inoculação, retirar 50g ou 50ml da amostra e transferir para frascos estéreis com tampas rosqueáveis. Conservar essa porção sob refrigeração, como contra-amostra.

Inocular os meios abaixo e, após a inoculação, cobrir a superfície de dois tubos de TAB (CA) com Ágar Selo ou Vaspar.

Caldo Thermoaciduran (TAB), também chamado de Caldo Ácido (CA)	4 tubos
Caldo Extrato de Malte (EM)	2 tubos
Caldo All Purpose Tween (APT), De Man Rogosa & Sharpe (MRS) ou Soro de Laranja (OSB) (opcionais, se houver suspeita de bactérias lácticas)	2 tubos
Caldo ALI (opcional, se houver suspeita de *Alicyclobacillus*)	2 tubos

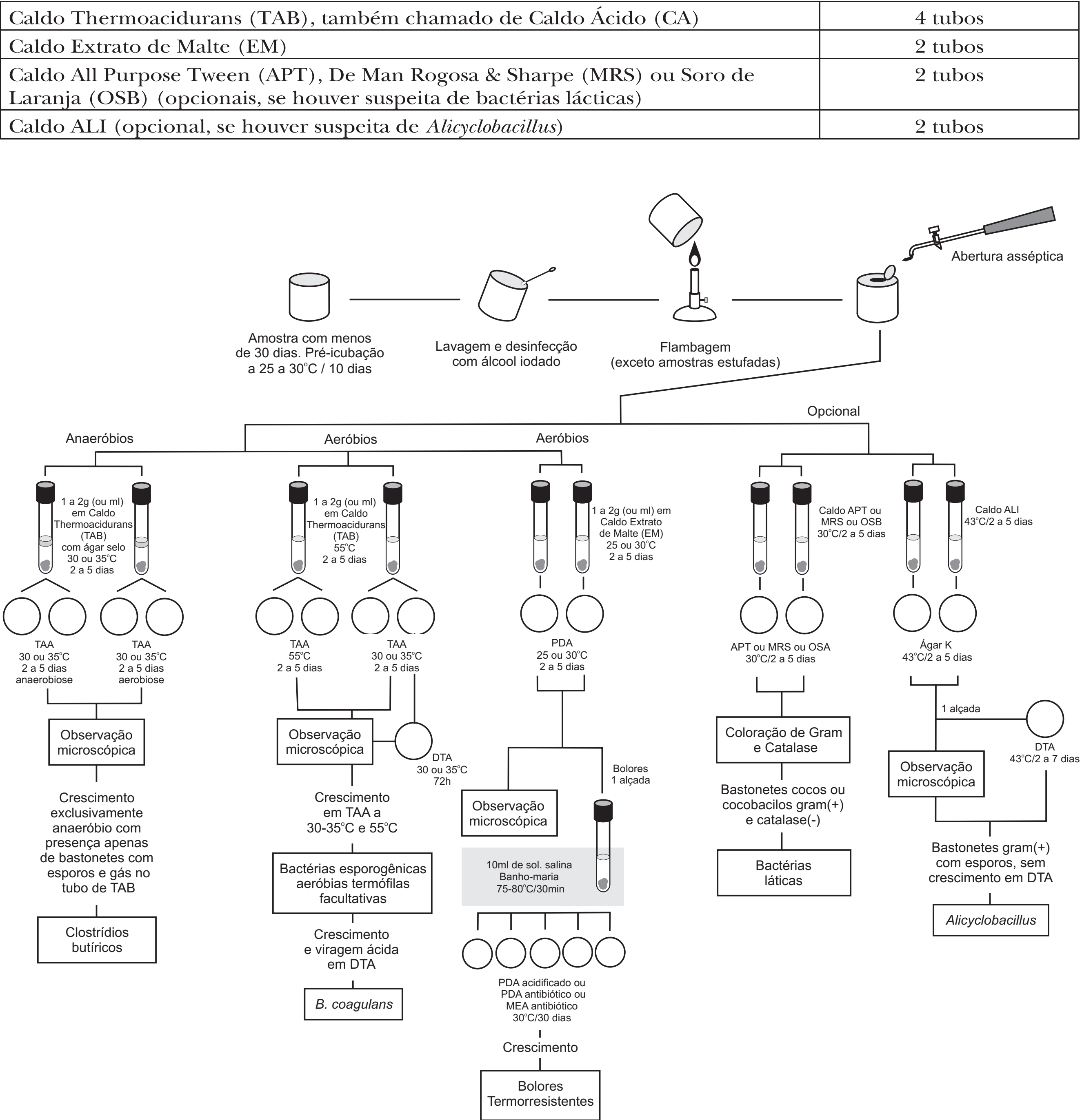


Figura 23.5. Esquema de análise para o teste de esterilidade comercial e causa da deterioração de alimentos ácidos.

f) Incubação

Incubar os tubos nas condições abaixo. Se o produto não se destinar à estocagem em temperatura acima de 40ºC, os tubos incubados 55ºC podem ser omitidos. Se o produto apresentar atividade de água inferior a 0,85, apenas a inoculação em PDA é necessária, os demais meios podendo ser omitidos.

Meio	Nº de tubos	Temperatura/ tempo de incubação	Atmosfera	Microbiota alvo
TAB (CA) com ágar selo	2 tubos	30 ou 35ºC / 2 a 5 dias	normal	Bactérias acidúricas mesófilas aeróbias e anaeróbias
TAB (CA) sem ágar selo	2 tubos	55ºC / 2 a 5 dias	normal	Bactérias acidúricas termófilas aeróbias
EM	2 tubos	25 ou 30ºC / 2 a 5 dias	normal	Bolores e leveduras
Caldo APT, MRS ou OSB	2 tubos	30ºC / 2 a 5 dias	normal	Bactérias lácticas
Caldo ALI	2 tubos	43ºC / 2 a 5 dias	normal	*Alicyclobacillus*

g) Caracterização dos microrganismos isolados em TAB (CA) 30/35ºC com ágar selo

Havendo crescimento nos tubos, submeter as culturas à caracterização. Em caso de dúvidas sobre o desenvolvimento de microrganismos (crescimento duvidoso), continuar o ensaio normalmente e, não havendo crescimento nas subculturas, considerar que não houve crescimento no tubo original.

Para verificar se a cultura é anaeróbia estrita ou facultativa, inocular uma alçada de cada tubo em duas placas de Ágar Thermoacidurans (TAA), por estrias de esgotamento. De cada par de placas, incubar uma sob condições anaeróbias e uma sob condições aeróbias, por dois a cinco dias, na mesma temperatura do tubo original. Crescimento exclusivo na placa anaeróbia indica cultura anaeróbia estrita. Crescimento nas duas placas (aeróbia e anaeróbia) indica cultura anaeróbia facultativa ou mistura de anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos. Observar se há produção de gás nos tubos e se há desenvolvimento de odor butírico nos tubos e placas.

Para a caracterização da morfologia das células, preparar um esfregaço ou uma montagem úmida da cultura obtida em cada placa, para coloração de Gram ou observação microscópica a fresco (procedimentos descritos no Capítulo 5). Selecionar para a caracterização uma colônia de cada tipo presente. Observar o(s) tipo(s) morfológico(s) das células, que podem ser bastonetes, cocos, cocobacilos, leveduras ou bolores. Havendo culturas de bastonetes, anotar se há formação de esporos.

h) Caracterização dos microrganismos isolados em TAB (CA) 55ºC sem ágar selo

Havendo crescimento nos tubos, submeter as culturas à caracterização. Em caso de dúvidas sobre o desenvolvimento de microrganismos (crescimento duvidoso), continuar o ensaio normalmente e, não havendo crescimento nas subculturas, considerar que não houve crescimento no tubo original.

Para verificar se a cultura é termófila estrita ou facultativa, inocular uma alçada de cada tubo em duas placas de Ágar Thermoacidurans (TAA), por estrias de esgotamento. De cada par de placas, incubar uma a 30 ou 35ºC por dois a cinco dias e uma a 55ºC por dois a cinco dias. Crescimento exclusivo na placa incubada a 55ºC indica cultura termófila estrita. Crescimento nas duas placas indica cultura termófila facultativa ou mistura de termófilas estritas e facultativas.

Para a caracterização da morfologia das células, preparar um esfregaço ou uma montagem úmida da cultura obtida em cada placa, para coloração de Gram ou observação microscópica a fresco (procedimentos descritos no Capítulo 5). Selecionar para a caracterização uma colônia de cada tipo presente. Observar o(s) tipo(s) morfológico(s) das células, que podem ser bastonetes, cocos, cocobacilos, leveduras ou bolores.

Para confirmar *Bacillus coagulans*, as culturas de bastonetes podem ser inoculadas em duas placas de Ágar Dextrose Triptona (DTA). Incubar uma placa a 30 ou 35ºC/72h e uma placa a 55ºC/72h. A ocorrência de crescimento nas duas placas, com viragem ácida do indicador (halo amarelo em redor das colônias) é confirmativa da presença de *B. coagulans*.

i) Caracterização dos microrganismos isolados em EM

Havendo crescimento nos tubos, submeter as culturas à caracterização. Em caso de dúvidas sobre o desenvolvimento de microrganismos (crescimento duvidoso), continuar o ensaio normalmente e, não havendo crescimento nas subculturas, considerar que não houve crescimento no tubo original.

Para verificar a presença de bolores termorresistentes, inocular uma alçada de cada tubo em uma placa de Ágar Batata Dextrose Acidificado (PDA). Incubar as placas a 25 ou 30ºC por dois a cinco dias e observar o desenvolvimento de colônias cotonosas, típicas de bolores, ou colônias não cotonosas, presuntivas de leveduras. Havendo colônias de bolores, suspender uma alçada de cada colônia em tubos com 10ml de solução salina estéril. Transferir os tubos para um banho com temperatura controlada entre 75 e 80ºC e manter no banho por 30min, garantindo que a superfície do líquido permaneça abaixo da superfície da água do banho. Distribuir os 10ml em cinco placas vazias (2ml/placa) e adicionar a cada placa, 15-20ml de Ágar Batata Dextrose (PDA) acidificado ou com antibióticos, que pode ser substituído por Ágar Extrato de Malte (MEA) com antibióticos. Acondicionar as placas em uma bolsa plástica estéril, fechar bem a bolsa (para evitar o ressecamento do meio de cultura) e incubar a 30ºC por até 30 dias. Examinar semanalmente se há desenvolvimento de colônias de bolores.

Para a caracterização da morfologia das células, preparar um esfregaço ou uma montagem úmida da cultura obtida em cada placa, para coloração de Gram ou observação microscópica a fresco (procedimentos descritos no Capítulo 5). Selecionar para a caracterização as colônia presuntivas de leveduras. Observar o(s) tipo(s) morfológico(s) das células, que podem ser leveduras ou bactérias (bastonetes, cocos, cocobacilos).

j) Caracterização dos microrganismos isolados em APT/MRS/OSB

Havendo crescimento nos tubos, submeter as culturas à caracterização. Em caso de dúvidas sobre o desenvolvimento de microrganismos (crescimento duvidoso), continuar o ensaio normalmente e, não havendo crescimento nas subculturas, considerar que não houve crescimento no tubo original.

Para confirmar a presença de bactérias lácticas, inocular uma alçada de cada tubo em uma placa de Ágar APT, MRS ou OSA. Incubar as placas a 30ºC por dois a cinco dias, em atmosfera microaerófila. Submeter pelo menos cinco colônias ao teste de catalase e à coloração de Gram, conforme procedimentos descritos no Capítulo 5. Observação de bastonetes, cocos ou cocobacilos Gram positivos, catalase negativos, é confirmativa da presença de bactérias lácticas.

k) Caracterização dos microrganismos isolados em Caldo ALI

Havendo crescimento nos tubos, submeter as culturas à caracterização. Em caso de dúvidas sobre o desenvolvimento de microrganismos (crescimento duvidoso), continuar o ensaio normalmente e, não havendo crescimento nas subculturas, considerar que não houve crescimento no tubo original.

Para verificar a formação de esporos e a morfologia das células, inocular uma alçada de cada tubo em uma placa de Ágar K, por estrias de esgotamento. Incubar as placas a 43°C/2 a 5 dias e preparar um esfregaço ou uma montagem úmida de cada tipo de colônia presente nas placas, para coloração de Gram ou observação microscópica a fresco (procedimentos descritos no Capítulo 5). Observar se o(s) tipo(s) morfológico(s) das células correspondem a bastonetes formadores de esporos. Nesse caso, observar se há desenvolvimento de odor estranho no Caldo ALI ou Ágar K.

Para verificar se a cultura é acidófila estrita, inocular uma alçada de cada tubo de Caldo ALI ou placa de Ágar K em uma placa de Ágar Dextrose Triptona (DTA). Incubar as placas de DTA a 43°C por dois a sete dias. As culturas de *Alicyclobacillus* não devem crescer no DTA, cujo pH é 6,7. A ocorrência de crescimento é indicativa da presença de microrganismos acidúricos, mas não acidófilos estritos.

23.3.3. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A interpretação depende da ocorrência ou não de crescimento, em que meios e condições de incubação ocorreu o crescimento e se a amostra apresentou ou não evidência de alteração.

a) Ausência de crescimento

Em amostras normais, sem evidência de alteração, a ausência de crescimento em qualquer dos tubos inoculados indica produto comercialmente estéril.

Em amostras alteradas, a ausência de crescimento em qualquer dos tubos inoculados pode indicar causas não microbianas da alteração ou perda da viabilidade da cultura depois do crescimento e alteração do produto. Isso é comum, por exemplo, com bactérias lácticas.

b) Crescimento

Em amostras aparentemente normais, sem evidência de alteração, a ocorrência de crescimento em um ou mais tubos pode indicar contaminação acidental. São suspeitas de contaminação acidental as seguintes situações: a) Crescimento em apenas um tubo da duplicata. b) Microbiota com características diferentes em cada tubo da duplicata. c) Crescimento anaeróbio com produção de gás a 30-35°C, quando a amostra não apresentou qualquer problema de estufamento ou perda de vácuo na pré-incubação. d) Fazendo uma observação microscópica direta da amostra, encontrar tipos morfológicos diferentes dos encontrados nas culturas. Nesses casos, repetir o ensaio com a contra-prova armazenada, observando criteriosamente os cuidados para evitar a contaminação acidental da amostra no laboratório. Não havendo indicação de contaminação acidental, interpretar os resultados conforme orientação do Quadro 23.3 e itens abaixo:

Em amostras alteradas, a ocorrência de crescimento é esperada. Interpretar os resultados conforme orientação do Quadro 23.3 e itens abaixo:

c) Crescimento a 30-35°C em TAB (CA) com ágar selo → TAA anaerobiose

A incubação anaeróbia do TAB ou TAA a 30-35°C objetiva verificar a presença de bactérias acidúricas esporogênicas mesófilas anaeróbias (clostrídios butíricos). Entretanto, diversos outros microrganismos podem crescer nessas condições:

c.1) Microbiota mista. O crescimento de microbiota mista com diferentes tipos morfológicos (bastonetes, cocos, cocobacilos, leveduras, bolores) revela a presença de um ou mais

grupos microbianos que não são formadores de esporos e não resistem ao processamento térmico de produtos ácido. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento. Verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

c.2) Cultura não esporogênica. O crescimento de apenas um tipo morfológico de microrganismo que não forma esporos (só bolores, só leveduras, só cocos ou só cocobacilos), revela a presença de microbiota não resistente ao processamento térmico de produtos de produtos ácidos. Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento. Verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

c.3) Cultura só de bastonetes. A interpretação depende da produção de esporos e do requerimento de oxigênio para crescimento (observada nas placas de TAA incubadas a 30-35°C em condições aeróbias e anaeróbias).

c.3.1) Crescimento exclusivamente anaeróbio com formação de esporos. O crescimento de bastonetes Gram positivos esporogênicos em condições exclusivamente anaeróbias, com produção de gás (em TAB) e desenvolvimento de odor butírico (em TAB ou TAA) confirma a presença de bactérias acidúricas esporogênicas mesófilas anaeróbias (clostrídios butíricos). Isso indica produto não comercialmente estéril, causa provável subprocessamento.

c.3.2) Crescimento aeróbio e anaeróbio. Revela a presença de anaeróbios facultativos ou mistura de anaeróbios estritos e facultativos. Se houver esporos, indica produto não comercialmente estéril, causa provável subprocessamento. Se não houver esporos, indica vazamento (verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico).

d) Crescimento em TAB (CA) → TAA a 55°C

A incubação do TAB ou TAA a 55°C objetiva verificar a presença de bactérias acidúricas esporogênicas termófilas, particularmente *B. coagulans*. A ocorrência de crescimento nas placas de DTA a 30-35 e 55°, com viragem ácida do indicador (halo amarelo em redor das colônias) confirma a presença de *B. coagulans*, indicando produto não comercialmente estéril, causa provável subprocessamento. *Alicyclobacillus* também pode se desenvolver no TAB ou no TAA, mas geralmente não se desenvolve no DTA. Crescimento exclusivo de termófilos estritos em produtos sem evidência de alteração e que não se destinam à estocagem em temperaturas elevadas, ainda indica esterilidade comercial. Se o produto estiver alterado, a presença desse grupo indica provável deterioração por resfriamento lento e/ou estocagem em temperaturas elevadas.

e) Crescimento em EM → PDA

A inoculação do EM ou PDA objetiva detectar a presença de bolores e leveduras, particularmente bolores termorresistentes. O crescimento de bolores termorresistentes indica produto não comercialmente estéril, causas provável subprocessamento. O crescimento de bolores não termorresistentes ou leveduras indica produto não comercialmente estéril, causa provável vazamento. Verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

Quadro 23.3. Interpretação dos resultados da determinação da causa da deterioração em alimentos ácidos.

Condição da lata	Odor	Aparência do produto	pH do produto	Exame microscópico	Cultura	Diagnóstico
Estufada, usualmente com corrosão interna	Normal a metálico	Normal ou espumosa	Normal	Negativo ou microrganismo escassos	Negativa	Corrosão, estufamento por hidrogênio. Confirmar a presença de H_2 (mais de 20%)
Estufada	Ácido (azedo)	Espumosa ou salmoura viscosa	Abaixo do normal	Cultura pura ou mista de bastonete, cocos ou leveduras	Crescimento aeróbio e/ou anaeróbio a 35°C e, possivelmente, a 55°C	Vazamento ou subprocessamento grosseiro
Estufada	Normal ou ácido "de queijo"	Espumosa	Normal ou ligeiramente abaixo do normal	Bastonetes médio curtos ou médio longos, usualmente com aspecto granular, esporos raramente presentes	Gás em condições anaeróbios a 55°C e, possivelmente, a 35°C (produção lenta)	Resfriamento inadequado ou estocagem à temperatura elevada (termófilos anaeróbios)
Estufada	Ácido butírico	Espumosa com bastante gás	Abaixo do normal	Bastonetes, coloração bipolar, prováveis esporos	Gás em condições anaeróbicas a 35°C. Odor ácido butírico	Subprocessamento (anaeróbios butíricos)
Estufada	Ácido	Espumosa	Abaixo do normal	Bastonetes curtos e longos.	Gás em condições anaeróbios, produção de ácido e possível produção de gás (aeróbia) em tubos com caldo a 35C. Possível crescimento a 55°C	Subprocessamento grosseiro (*Lactobacillus*)
Sem vácuo e/ou deformada	Normal	Normal	Normal ou ligeiramente abaixo do normal	Ausência ou número moderado de microrganismos	Negativo	Exaustão insuficiente. Branqueamento insuficiente. Resfriamento inadequado. Sobre-enchimento. Deterioração insipiente
Normal, com ou sem vácuo	Ácido ou medicinal	Normal	Pouco ou bastante abaixo do normal	Bastonetes, usualmente com aspecto granular	Crescimento sem gás a 55°C e, possivelmente, a 30- 35°C. Crescimento em caldo ácido (pH = 5,0)	Subprocessamento (*B. coagulans*)
Normal com ou sem vácuo	Normal ou ácido	Normal ou salmoura turva	Pouco ou bastante abaixo do normal	Cultura pura ou mista de bastonetes, cocos ou bolores	Crescimento em condição aeróbia e/ou anaeróbia a 35°C e, possivelmente, a 55°C	Vazamento ou subprocessamento grosseiro. Bolores presentes: vazamento.

f) Crescimento em Caldo APT, MRS, OSB → Ágar APT, MRS ou OSA

A inoculação do APT, MRS ou OSB objetiva verificar a presença de bactérias lácticas, confirmadas pela observação de bastonetes, cocos ou cocobacilos Gram positivos, catalase negativos, não esporogênicos. Isso indica produto não comercialmente estéril, causas prováveis vazamento ou subprocessamento grosseiro. Verificar a presença de pontos de vazamento na embalagem, para confirmação do diagnóstico.

g) Crescimento em Caldo ALI → Ágar K

A inoculação do Caldo ALI ou Ágar K objetiva verificar a presença de *Alicyclobacillus*, confirmada pela observação de bastonetes Gram positivos esporogênicos acidófilos estritos, normalmente incapazes de crescer em placas de DTA ou em outros meios de cultura com pH neutro. Isso pode ser considerado indicativo de produto não comercialmente estéril, causa provável subprocessamento térmico.

23.4. REFERÊNCIAS

BANKS, J.G. The spoilage potencial of *Sporolactobacillus*. *Technical Bulletin Nº 66*, The Campden Food and Drink Research Association, England, 1989.

BAYNE, H.G. & MICHENER, H.D., 1979. Heat resistance of *Byssochlamys* ascospores. *Appl. Environ. Microbiol. 37*:449-453.

CASELLA, M.L.A., MATASCI, F & SCHMIDT-LORENZ, W., 1990. Influence of age, growth medium, and temperature on heat resistance of *Byssochlamys nivea* ascospores. *Lebensm. Wiss. Technol. 23*:404-411.

DEIBEL, K.E. & Jantschke, M. Canned foods – Testes for commercial sterility. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 61, p.577-582.

DENNY, C.B. & PARKINSON, N.G. Canned foods – Testes for cause of spoilage. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 62, p.583-600.

GERMER, S.P.M., MOURA, S.C.S.R., LEITÃO, M.F.F. *et al. Princípios de Esterilização de Alimentos.* Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas (SP), 1995.

HERSON, A.C. & HULLAND, E.D. *Canned Foods: Thermal Processing and Microbiology, 7th Ed.* Edinburgh, England: Churchill Livingstone, 1980.

INGRAM, M. Sporeformers as food spoilage oraganisms. In: GOULD, G.W. & HURST, A. (Eds), *The Bacterial Spore.* Academic Press, New York, 1969. p.549-610.

ISO 11137. *Sterilization of health care products* - Requirements for validation and routine control - Radiation sterilization. The International Organization for Standardization, 1995.

KING, A.D., MICHENER, H.D. & ITO, K.A., 1969. Control of *Byssochlamys* and related heat-resistant fungi in grape products. *Appl. Microbiol. 18*:166-173.

LANDRY, W.L., SCHWAB, A.H. & LANCETTE, G.A. Examination of Canned Foods. In: U. S. Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online*, disponível no site <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>, Chapter 21A, revisão de janeiro de 2001.

MFHPB-01. Determination of Commercial Sterility and the Presence of Viable Microorganisms in Canned Foods. In: *Compendium of Analytical Methods, Volume 2.* Government of Canada, Health Products and Food Branch, March 2001. Disponível no site <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index_e.html>.

NCA (National Canners Association). *Laboratory Manual for Food Canners and Processors,* Volume 1 – Microbiology and Processing. The AVI Publishing Company, Inc, Westport, Connecticut, 1968.

PALOP, A., ÁLVAREZ, I., RASO, J. CONDÓN, S. 2000. Heat Resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in Water, Various Buffers, and Orange Juice. *Journal of Food Protection 63 (10)*:1377–1380.

PENNA, T.C.V & MACHOSHVILI, I.A., 1997. Esterilização térmica. Conceitos básicos da cinética de morte microbiana. *Revista Farmácia Bioquímica Univ. São Paulo, Supl. 1*: 1-5.

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. (eds). *Fungi and Food Spoilage, 2nd Ed.* Blackie Academic & Professional, London, 1997.

SPLITTSTOESSER, D.F. & SPLITTSTOESSER, C.M., 1977. Ascospores of *Byssochlamys fulva* compared with those of heat resistant *Aspergillus. J. Food Sci. 42*:685-688.

STUMBO, C.R. *Thermobacteriology in Food Processing, 2nd Ed.* Academic Press, New York, 1973.

UBOLDI EIROA, M.N., JUNQUEIRA, V.C.A. & SCHMIDT, F.L., 1999. *Alicyclobacillus* in Orange Juice: Occurrence and Heat Resistance of Spores. *Journal of Food Protection 62(8)*:883–886.

Capítulo 24

Pseudomonas

24.1. INTRODUÇÃO

As informações abaixo são da 1ª e a 2ª edições do *Bergey`s Manual* of *Systematic Bacteriology* (Krieg & Holt, 1984, Garrity *et al.*, 2005) e de Euzéby (2010).

Pseudomonas são bactérias cuja principal característica é a extrema versatilidade metabólica e nutricional, que permite a utilização de uma enorme variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Em função dessa versatilidade, ocupam nichos ecológicos muito diversos, sendo amplamente distribuídas na natureza, na água e nos alimentos.

Esse gênero tem passado por grandes mudanças taxonômicas, que começaram já na 1ª edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg & Holt, 1984). Nessa edição as espécies foram divididas em cinco grupos, com base na similaridade do rRNA. Esses cinco grupos serviram de base para os estudos posteriores, que levaram à criação de vários novos gêneros, apresentados no Quadro 24.1.

Grupo I. No grupo I se encontrava o maior número de espécies e, em função disso, para esse grupo foi mantido o nome genérico de *Pseudomonas.*

Grupo II. As espécies do grupo II (*P. cepacia*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. pickettii* e *P. solonacearum*) foram transferidas para o novo gênero *Burkholderia.* Posteriormente *P. pickettii* e *P. solonacearum* foram realocadas no novo gênero *Ralstonia.*

Grupo III. As espécies do grupo III foram subdivididas em cinco gêneros: *P. delafieldi* e *P. facilis* foram transferidas para o novo gênero *Acidovorax. P. flava*, *P. pseudoflava* e *P. palleronii* foram transferidas para o novo gênero *Hydrogenophaga. P saccharofila* foi transferida para o novo gênero *Pelomonas. P. testosteroni* e *P. acidovorans* foram transferidas para o novo gênero *Comamonas*, mas posteriormente *P.acidovorans* foi realocada no novo gênero *Delftia.*

Grupo IV. As espécies do grupo IV (*P. diminuta* e *P. vesiculares*) foram transferidas para o novo gênero *Brevundimonas.*

Grupo V. A única espécie do grupo V (*P. maltophilia*) foi inicialmente transferida para o gênero *Xanthomonas*, mas posteriormente foi realocada novo gênero *Stenotrophomonas.*

Outras espécies. Além das espécies dos cinco grupos, muitas outras espécies estavam descritas na 1ª edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, mas com afiliação e/ou nomenclatura incerta. Muitas dessas espécies também foram transferidas para novos gêneros ou para outros gêneros já existentes (Quadro 24.1).

Dentre as espécies realocadas em novos gêneros, algumas são comuns em alimentos, incluindo *Shewanella putrefaciens*, *Janthinobacterium lividum* e *Stenotrophomonas maltophilia.*

Quadro 24.1. Alterações na nomenclatura das espécies de *Pseudomonas*.

Espécie*	Alterações**
P. acidovorans	*Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926) Wen *et al.* 1999, comb. nov
P. aminovorans	*Aminobacter aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) Urakami *et al.* 1992, comb. nov.
P. andropogonis	*Burkholderia andropogonis* (Smith 1911) Gillis *et al.* 1995, comb. nov.
P. antimicrobica	*Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi *et al.* 1993, comb. nov.
P. avenae	*Acidovorax avenae* (Manns 1909) Willems *et al.* 1992, comb. nov.
P. beijerinckii	*Chromohalobacter beijerinckii* (Hof 1935) Peçonek *et al.* 2006, comb. nov.
"P. carboxydovorans"	*Oligotropha carboxidovorans* (*ex* Meyer and Schlegel 1978) Meyer *et al.* 1994, nom. rev., comb. nov.
P. caryophylli	*Burkholderia caryophylli* (Burkholder 1942) Yabuuchi *et al.* 1993, comb. nov.
P. cattleyae	*Acidovorax cattleyae* (Pavarino 1911) Schaad *et al.* 2009, comb. nov.
P. cepacia	*Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) Yabuuchi *et al.* 1993, comb. nov.
P. cocovenenans	*Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi *et al.* 1993
"P. compransoris"	*Zavarzinia compransoris* (*ex* Nozhevnikova and Zavarzin 1974) Meyer *et al.* 1994, nom. rev., comb. nov.
P. delafieldii	*Acidovorax delafieldii* (Davis 1970) Willems *et al.* 1990, comb. nov.
P. diminuta	*Brevundimonas diminuta* (Leifson and Hugh 1954) Segers *et al.* 1994, comb. nov.
P. doudoroffii	*Oceanimonas doudoroffii* corrig. (Baumann *et al.* 1972) Brown *et al.* 2001, comb. nov.
P. echinoides	*Sphingomonas echinoides* (Heumann 1962) Denner *et al.* 1999, comb. nov.
P. elongata	*Microbulbifer elongatus* (Humm 1946) Yoon *et al.* 2003, comb. nov.
"P. extorquens"	*Methylobacterium extorquens* (Urakami & Komagata 1984) Bousfield & Green 1985 emend. Kato *et al.* 2008
P. facilis	*Acidovorax facilis* (Schatz and Bovell 1952) Willems *et al.* 1990, comb. nov.
P. flava	*Hydrogenophaga flava* (Niklewski 1910) Willems *et al.* 1989, comb. nov.
P. gladioli	*Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi *et al.* 1993, comb. nov.
P. glathei	*Burkholderia glathei* (Zolg and Ottow 1975) Vandamme *et al.* 1997, comb. nov.
P. glumae	*Burkholderia glumae* (Kurita and Tabei 1967) Urakami *et al.* 1994, comb. nov.
P. huttiensis	*Herbaspirillum huttiense* (Leifson 1962) Ding and Yokota 2004, comb. nov.
P. indigofera	*Vogesella indigofera* (Voges 1893) Grimes *et al.* 1997, comb. nov.
P. iners	*Marinobacterium georgiense* González *et al.* 1997 emend. Satomi *et al.* 2002.
P. lanceolata	*Curvibacter lanceolatus* (Leifson 1962) Ding and Yokota 2004, comb. nov.
P. lemoignei	*Paucimonas lemoignei* (Delafield *et al.* 1965) Jendrossek 2001, comb. nov.
P. luteola	*Chryseomonas luteola* (Kodama *et al.* 1985) Holmes *et al.* 1987, comb. nov.
P. mallei	*Burkholderia mallei* (Zopf 1885) Yabuuchi *et al.* 1993, comb. nov.
P. maltophilia	*Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993, comb. nov.
P. marina	*Cobetia marina* (Cobet *et al.* 1970) Arahal *et al.* 2002, comb. nov.
P. mephitica	*Janthinobacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley *et al.* 1978 (Approved Lists 1980)
P. mesophilica	*Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) Green and Bousfield 1983, comb. nov.
P. mixta	*Telluria mixta* (Bowman *et al.* 1989) Bowman *et al.* 1993, comb. nov.
P. nautica	*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier *et al.* 1992.
P. palleronii	*Hydrogenophaga palleronii* (Davis 1970) Willems *et al.* 1989, comb. nov.
P. paucimobilis	*Sphingomonas paucimobilis* (Holmes *et al.* 1977) Yabuuchi *et al.* 1990, comb. nov.
P. phenazinium	*Burkholderia phenazinium* (Bell and Turner 1973) Viallard *et al.* 1998, comb. nov.
P. pickettii	*Ralstonia pickettii* (Ralston *et al.* 1973) Yabuuchi *et al.* 1996, comb. nov.
P. plantarii	*Burkholderia plantarii* (Azegami *et al.* 1987) Urakami *et al.* 1994, comb. nov.
P. pseudoflava	*Hydrogenophaga pseudoflava* (Auling *et al.* 1978) Willems *et al.* 1989, comb. nov.
P. pseudomallei	*Burkholderia pseudomallei* (Whitmore 1913) Yabuuchi *et al.* 1993, comb. nov.
P. putrefasciens	*Shewanella putrefaciens* (Lee *et al.* 1981) MacDonell and Colwell 1986, comb. nov.
P. pyrrocinia	*Burkholderia pyrrocinia* (Imanaka *et al.* 1965) Vandamme *et al.* 1997, comb. nov.
P. radiora	*Methylobacterium radiotolerans* corrig. (Ito and Iizuka 1971) Green and Bousfield 1983, comb. nov.
P. rhodos	*Methylobacterium rhodinum* corrig. (Heumann 1962) Green and Bousfield 1983, comb. nov.
P. riboflavina	*Devosia riboflavina* (*ex* Foster 1944) Nakagawa *et al.* 1996, nom. rev., comb. nov.
"P. rosea"	*Methylobacterium zatmanii* Green *et al.* 1988 (algumas cepas) *Methylobacterium rhodesianum* Green *et al.* 1988, sp. nov. (algumas cepas)
P. rubrilineans	*Acidovorax avenae* (Manns 1909) Willems *et al.* 1992, comb. nov.
P. rubrisubalbicans	*Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Christopher and Edgerton 1930) Baldani *et al.* 1996, comb. nov.
P. saccharophila	*Pelomonas saccharophila* (Doudoroff 1940) Xie and Yokota 2005, comb. nov.
P. solanacearum	*Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996, comb. nov.
P. spinosa	*Malikia spinosa* (Leifson 1962) Spring *et al.* 2005, comb. nov.
P. stanieri	*Marinobacterium stanieri* (Baumann *et al.* 1983) Satomi *et al.* 2002, comb. nov.
P. syzygii	*Ralstonia syzygii* (Roberts *et al.* 1990) Vaneechoutte *et al.* 2004, comb. nov.
P. taeniospiralis	*Hydrogenophaga taeniospiralis* (Lalucat *et al.* 1982) Willems *et al.* 1989, comb. nov.
P. testosteroni	*Comamonas testosteroni* (Marcus and Talalay 1956) Tamaoka *et al.* 1987, comb. nov.
P. vesicularis	*Brevundimonas vesicularis* (Büsing *et al.* 1953) Segers *et al.* 1994, comb. nov.
P. woodsii	*Burkholderia andropogonis* (Smith 1911) Gillis *et al.* 1995.

* Os nomes entre aspas não eram oficiais.
Fontes: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2[nd] Ed. (Garrity *et al.*, 2005), Euzéby (2010).

Pseudomonas Migula 1894

As espécies de *Pseudomonas* são bastonetes retos ou ligeiramente curvos, Gram negativos, móveis em sua maioria, apresentando um ou mais flagelos polares, algumas espécies podendo também formar flagelos laterais. Não formam esporos. Quimiorganotróficas, não exigem fatores nutricionais de crescimento, podendo crescer em meios mínimos quimicamente definidos, usando um único composto como fonte de carbono e amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio. O metabolismo é estritamente respiratório, usando oxigênio como aceptor final de elétrons e exigindo condições aeróbias. Algumas espécies, entretanto, podem usar o nitrato como aceptor de elétrons, o que permite o crescimento em condições anaeróbias (reduzem o nitrato a nitrito ou nitrogênio, fenômeno chamado de denitrificação). A temperatura ótima da maioria das espécies é por volta de 28ºC, algumas espécies crescem a 45ºC e várias crescem bem a 4ºC (psicrotróficas). Não toleram condições ácidas e nenhuma espécie cresce em pH menor ou igual a 4,5. Catalase positivas, oxidase positivas ou negativas. Várias espécies formam pigmentos fluorescentes (fenazinas verdes, azuis ou laranja ou pioverdinas verde amareladas), não fluorescentes (verdes, laranja, amarelos ou azuis) ou ambos.

Várias espécies de *Pseudomonas* são patógenos de plantas e várias são patógenos oportunistas para humanos, associadas com infecções em indivíduos com o sistema imunológico debilitado. No homem a espécie mais importante é *Pseudomonas aeruginosa*, mas *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* e *Pseudomonas pseudoalcaligenes* também são isoladas de espécimes clínicos. Depois de *P. aeruginosa*, as espécies mais freqüentes são *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. stutzeri*, embora essas espécies apresentem um grau de virulência menor e um poder invasivo mais limitado.

Pseudomonas podem ser encontradas na água (doce, salobra ou do mar), no solo, na poeira em suspensão, no ar e nos vegetais. Muitas cepas são psicotróficas e podem alterar gêneros alimentícios, reagentes biológicos, solutos injetáveis, sangue e derivados sanguíneos conservados sob refrigeração. Também em função da riqueza das suas vias metabólicas, frequentemente conseguem resistir a numerosos anti-sépticos e antibióticos. Isso explica sua presença cada vez mais freqüente no ambiente hospitalar, sendo isoladas de locais úmidos como pias, sifões, roupas e objetos de lavabo, recipientes que contêm água etc. Raramente são encontradas na pele ou nos músculos de humanos e animais, mas são comuns na flora intestinal (Euzéby, 2006).

***Pseudomonas* em água tratada para consumo humano**. *Pseudomonas* são extremamente comuns em água bruta e também são encontradas em água tratada. O tratamento da água bruta objetiva a destruição de patógenos, sendo normal e aceitável a presença de microrganismos viáveis depois do tratamento, em contagens de até 100 UFC/ml (Portaria 518/2004). Contagens mais elevadas no ponto de consumo refletem crescimento ou recontaminação no sistema de distribuição, isto é, nos reservatórios e tubulações. O crescimento pode ocorrer devido à sobrevivência e recuperação de células injuriadas de microrganismos nativos, incluindo *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter* e *Aeromonas* (ICMSF, 2000).

***Pseudomonas* em água mineral e água natural**. Água mineral é definida como a água obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de fontes subterrâneas. Caracteriza-se pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes, considerando-se as flutuações naturais. A água natural também é obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de fontes subterrâneas, mas com conteúdo de sais minerais, oligoelementos e outros constituintes em níveis inferiores aos mínimos estabelecidos para água mineral (Resolução RDC 274, 2005).

No ponto de emergência a água mineral e a água natural apresentam uma microbiota normal entre 10 e 100 UFC/ml, composta primordialmente de *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Xanthomonas*. Essa microbiota natural geralmente é aeróbia, apresenta requerimento de nitrogênio muito baixo e é capaz de crescer em baixas temperaturas, com pequenas quantidades de compostos de carbono (ICMSF, 2000).

Depois de engarrafada, a multiplicação dessa microbiota na água é normal, caracterizada por uma alternância entre aumento e redução na contagem. Imediatamente após o envase a população aumenta, utilizando a matéria orgânica da superfície das embalagens e o oxigênio dissolvido durante a operação de envase. Doze horas após o envase a contagem geralmente atinge valores dez vezes maiores do que o normal no ponto de emergência, mas pode chegar a 10^4-10^5 UFC/ml (em placas incubadas a 20-22ºC/72h). As contagens mais altas são mais comuns na água engarrafada em embalagens plásticas, provavelmente porque o plástico é uma superfície mais favorável ao crescimento microbiano (ICMSF, 2000). Depois disso a população declina, devido ao esgotamento dos nutrientes, mas volta a crescer, utilizando a matéria orgânica das células mortas e assim por diante.

Várias espécies de *Pseudomonas* têm sido isoladas de água mineral, incluindo *P. mandelii*, *P. migulae*, *P. rhodesiae* e *P. veronii*, mas a principal preocupação é a presença de *P. aeruginosa*, por ser a mais comum como patógeno oportunista para humanos.

***Pseudomonas* em alimentos**. A ocorrência de *Pseudomonas* em alimentos é extremamente comum, associadas com a deterioração de carne e derivados, leite e derivados, peixes e frutos do mar, ovos e vegetais.

Em carne de aves cruas, mantida em temperatura de 2ºC negativos a 5ºC, as pseudomonas são os principais deteriorantes, porque têm o menor tempo de geração nessas baixas temperaturas. Dentre as espécies presentes encontram-se *P. fragi*, *P. fluorescens* e *P. putida* (ICMSF, 2000).

Em carne bovina não processada e mantida sob refrigeração, as pseudomonas representam mais de 50% da microbiota deteriorante, sendo *P. fragi*, *P. lundensis* e *P. fluorescens* as espécies mais freqüentes . No início da deterioração as pseudomonas provocam um odor adocicado de fruta, devido à formação de ésteres etílicos. Nos estágios mais avançados, a produção de compostos sulfurosos causam odor pútrido (ICMSF, 2000). Em carne cosida não curada, embalada em atmosfera normal e refrigerada, as bactérias Gram negativas, incluindo *Pseudomonas*, também são os principais deteriorantes (ICMSF, 2000).

Em leite pasteurizado mantido sob refrigeração, as pseudomonas fazem parte da microbiota deteriorante, porque embora não sobrevivam à pasteurização, são recontaminantes normais no pós processamento. Também não sobrevivem no leite esterilizado, mas suas enzimas lipolíticas e proteolíticas podem permanecer e causar alterações. No creme de leite termoprocessado, a recontaminação pós processo por pseudomonas tem forte impacto na qualidade (ICMSF, 2000). As espécies mais comuns são *P. fragi*, *P. fluorescens* e *P. taetrolens*, além de *P. synxantha* em creme de leite, onde produz um pigmento amarelo forte a laranja, (Krieg & Holt, 1984, Garrity *et al.*, 2005).

Em ovos crus inteiros, as pseudomonas são a principal causa de deterioração, porque geralmente são os primeiros microrganismos a penetrar a casca e são resistentes aos agentes antimicrobianos naturais da clara. Dentre as espécies encontradas estão *P. putida* (provoca fluorescência na clara), *P. fluorescens* (provoca coloração rosa na clara), *P. mucidolens* e *P. taetrolens* (ICMSF, 2000, Krieg & Holt, 1984, Garrity *et al.*, 2005).

Shewanella MacDonell & Colwell 1986

As espécies do gênero *Shewanella* são Gram negativas, na forma de bastonetes, móveis, oxidase e catalase positivas. As colônias frequentemente são róseas alaranjadas, salmão ou levemente bronzeadas, devido ao acúmulo de citocromo. O metabolismo é respiratório, usando oxigênio como aceptor final de elétrons, mas podem crescer em condições anaeróbias, usando nitrato, nitrito, Fe^{3+}, Mn^{3+}, fumarato e vários compostos sulfurosos como aceptores finais de elétrons (respiração anaeróbia). Trimetilamina N-óxido (TMAO) também pode ser usado como aceptor final de elétrons e a sua redução à trimetilamina é geralmente responsável pelo odor associado à deterioração de alimentos por *Shewanella*. Três espécies também apresentam metabolismo fermentativo, *S. frigidimarina* e *S. benthica*, que fermentam glicose, e *S. gelidimarina*, que fermenta N-acetilglicosamina. A maioria das espécies cresce a 4ºC e forma H_2S a partir do tiossulfato. Várias espécies exigem NaCl para crescimento. Duas espécies estão entre os principais deteriorantes de alimentos, *S. putrefaciens* e *S. baltica*, encontradas em produtos lácteos, produtos cárneos, pescados e frutos do mar.

Shewanella putrefaciens **(sinônimo *Pseudomonas putrefaciens*)** foi primeiramente descrita em 1931, como *Achromobacter putrefaciens* . Em 1941 foi transferida para o gênero *Pseudomonas*, em função da morfologia de bastonete, motilidade e metabolismo estritamente respiratório, não fermentativo. Com base no valor do mol% G+C, menor do que o das pseudomonas, em 1971 foi transferida para o gênero *Alteromonas*. Finalmente, com base na seqüência do rRNA 5S, em 1986 foi transferida para o novo gênero *Shewanella*. A nomenclatura dessa espécie, continua em evolução, porque é composta de uma variedade de cepas heterogêneas, que inclui pelo menos quatro grupos de hibridização de DNA. As cepas dos grupos IV foram transferidas para a nova espécie *S. algae* (em 1990) e as cepas do grupo II para a nova espécie *S. baltica* (em 1998). As cepas do grupo I são consideradas *S. putrefaciens* "senso stricto" e as do grupo III ainda não têm uma nova posição taxonômica definida. As principais características desses quatro grupos encontram-se descritas no Quadro 24.2.

Forma colônias opacas, circulares, convexas, com margens perfeitas, consistência de borracha e coloração levemente bronzeadas, salmão ou róseas em Ágar Nutriente. Não exige NaCl ou fatores de crescimento. Mesófila, cresce entre 10 e 40ºC, com ótimo entre 30 e 35ºC, mas há cepas psicrotolerantes que crescem a 4ºC. Ocasionalmente implicada em bacteremia, septicemia, infecções oculares, pneumonia, artrite e peritonite.

Quadro 24.2. Características que diferenciam as cepas de *S. putrefaciens* "senso stricto", *S. algae*, *S. baltica* e *S. putrefaciens* Grupo III (Garrity *et al.*, 2005).

Característica	*S. putrefaciens* "senso stricto" (Grupo I)	*S. algae* (Grupo IV)	*S. baltica* (Grupo II)	*S. putrefaciens* (Grupo III)
Crescimento a 4ºC	+	-	+	d
Crescimento a 37ºC	+	+	-	+
Crescimento a 42ºC	-	-	-	d
Tolerância a 6% de NaCl	-	+	-	-
Redução do sulfito a H_2S	+	d	-	-
Ácido a partir de glicose	-	d (fraco)	+	+
Ácido a partir de maltose e sacarose	-	-	+	+
Crescimento em Ágar *Salmonella-Shigella* (SS)	+	+	-	-
Teste de citrato (Christensen)	-	-	+	-
Urease	-	d	d	-

Símbolos: + = 90% ou mais cepas positivas, - = 90% ou mais cepas negativas, d = 11 a 89% das cepas positivas.

Shewanella putrefaciens é um deteriorante comum em carne de aves cruas, onde provoca odor sulfídrico. Atinge principalmente carnes com pH acima de seis, como os cortes da coxa e sobrecoxa, que têm um pH mais alto do que a carne do peito (ICMSF, 2000).

Em carne bovina crua embalada a vácuo, *Shewanella putrefaciens* é forte produtora de H_2S e deteriora rapidamente os produtos com pH mais alto (ICMSF, 2000).

Janthinobacterium De Ley *et al.* 1978 emend. Lincoln *et al.* 1999

As espécies do gênero *Janthinobacterium* são Gram negativas, na forma de bastonetes, móveis, oxidase e catalase positivas. Quimiorganotróficas, aeróbias estritas, apresentam metabolismo respiratório, usando oxigênio como aceptor final de elétrons. Crescem bem em meios comuns à base de peptonas e podem usar citrato e amônia como únicas fontes carbono e energia, respectivamente. Produzem pouco ácido a partir de glicose e outros carboidratos, sem formação de gás. A faixa de temperatura de crescimento é de quatro a 30ºC, com ótimo em 25ºC. Não crescem a 37ºC. O pH ótimo é de 7,0 a 8,0 e não crescem abaixo de 5,0. Várias cepas produzem o pigmento violeta violeceína e outras não são pigmentadas ou são parcialmente pigmentadas (uma mesma cultura forma tanto colônias pigmentadas como não pigmentadas).

***Janthinobacterium lividum* (sinônimo *Pseudomonas mephitica*)**. *Pseudomonas mephitica* foi o nome inicialmente proposto por Claydon & Hammer (1939) para uma nova espécie de bactéria isolada de manteiga deteriorada. A deterioração é caracterizada por um odor fétido, como o exalado pelo cangambá (*Mephitis mephitis*), um mamífero semelhante ao gambá (*Didelphis marsupialis*) e à jaritataca (*Conepatus semistriatu*). Anzai *et al.* (2000) relataram uma estreita relação filogenética entre *P. mephitica* e *Janthinobacterium lividum*, espécie descoberta em 1891 (como *Bacillus lividus*) e também já chamada de *Chromobacterium lividum*. A maioria das cepas de *J. lividum* produz o pigmento violeta violeceína, mas há cepas que, assim como *P. mephitica*, não são pigmentadas. Em 2008, com base na comparação da seqüência do rRNA 16S e inúmeras características fenotípicas, *P. mephitica* foi reconhecida como sinônimo de *J. lividum* (Kämpfer *et al.*, 2008).

A descrição original de Claydon & Hammer (1939) para *P. mephitica* destaca as seguintes características: morfologia de bastonetes, Gram negativa, móvel, não esporogênica. Temperatura ótima por volta de 21ºC, cresce lentamente a 5ºC e a 30ºC, não cresce a 37ºC. Cresce em pH 5,0 e em 7,5. Não produz ácido a partir de lactose e produz lentamente a partir de maltose e glicose, com tendência à reversão. Não pigmentada.

As descrições da 2ª edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity *et al.*, 2005) e de Euzéby (2004) para *J. lividum* destacam as seguintes características, além das que são comuns à todas as espécies do gênero: Estritamente aeróbio, não cresce em condições anaeróbias. Mais de 90% das cepas produz violeceína (as cepas anteriormente chamadas de *P. mephitica* não produzem). A maioria das cepas cresce a 4ºC, nenhuma cresce a 37ºC. A maioria não cresce em 2% de NaCl ou acima. A maioria cresce em pH 5,0 mas poucas crescem em pH 4,0. As colônias têm aspecto gelatinoso ou de borracha e, em caldo, as cepas pigmentadas provocam a formação de um anel violeta na superfície. Em ágar a pigmentação violeta das colônias geralmente é pouco intensa e aparece lentamente. Cerca de 50% das cepas cresce em ágar MacConkey.

Janthinobacterium lividum é isolado do solo, da água doce, do ambiente marinho e das águas residuais. A contaminação de gêneros alimentícios por cepas de pigmentadas pode provocar a formação de manchas azuis. Assim como as pseudomonas, é um dos principais deteriorantes de carne de aves cruas mantidas sob refrigeração (ICMSF, 2000). Em carne bovina crua, pode provocar a produção de H_2S, às vezes acompanhado de descoloração esverdeada (Tompkin *et al.*, 2001). Em leite e produtos lácteos provoca odor fétido (Euzéby, 2004).

Stenotrophomonas Palleroni & Bradbury 1993

Esse gênero foi criado para acomodar *Pseudomonas maltophilia*, espécie que havia sido transferida para o gênero *Xanthomonas*, mas sem a aceitação de muitos taxonomistas. Durante vários anos *S. maltophilia* foi a única espécie do gênero, que posteriormente recebeu duas novas espécies. São bactérias Gram negativas, na forma de bastonetes, não esporogênicas, móveis, catalase e gelatinase positivas. Não dispõem de citocromo c, apresentando reação de oxidase negativa. Na descrição original do novo gênero *Stenotrophomonas*, entretanto, foram erradamente descritas como oxidase positivas (Palleroni & Bradbury 1993). Aeróbias, apresentam metabolismo estritamente respiratório, usando oxigênio como aceptor final de elétrons. Reduzem o nitrato mas, ao contrário das pseudomonas, não conseguem utilizá-lo como única fonte de nitrogênio para o crescimento. Formam colônias amarelas, esverdeadas ou cinzas, que podem adquirir uma coloração castanha com o tempo de incubação. Não crescem a quatro ou a 41ºC, com temperatura ótima por volta de 35ºC. Apresentam forte atividade lipolítica, caracterizada pela hidrólise de Tween 80. Exigem fatores de crescimento, principalmente metionina.

***Stenotrophomonas maltophilia* (sinônimo *Pseudomonas maltophilia*)**. *S. maltophilia* não é nutricionalmente tão versátil como as pseudomonas, fato que serviu de base para a denominação do novo gênero *Stenotrophomonas* (do grego, significa unidade que consegue utilizar poucos substratos). Caracteristicamente capaz de utilizar dissacarídeos (maltose, lactose, celobiose) como únicas fontes de carbono e energia, o que também é raro entre as pseudomonas. O crescimento em lactose é mais pobre, provavelmente porque não utiliza a galactose. Produz ácido a partir de maltose, mas não partir de glicose. As colônias são amareladas em vários meios de cultura, produzindo pigmentos que não se difundem, provavelmente flavinas. Várias cepas desenvolvem uma coloração castanha em meios sólidos.

Patógeno oportunista, tem sido associada a vários tipos de infecções em humanos e isolada de culturas de tecidos, soluções de streptomicina, água destilada, respiradores, nebulizadores e tubos de coleta de sangue (Garrity *et al.*, 2005). Comum na risosfera de várias plantas cultivadas como couves, uva, mostarda, milho e beterraba (Garrity *et al.*, 2005). Encontrada em água doce e em alimentos como leite cru e pasteurizado, produtos lácteos peixes congelados (Garrity *et al.*, 2005) e ovos deteriorados, onde produz sulfeto férrico, formando riscos escuros na gema) (ICMSF, 2000).

Métodos de análise

Na análise de alimentos a contagem é feita para o gênero *Pseudomonas* como um todo, sem diferenciação das espécies. A legislação brasileira não estabelece padrão para esses microrganismos, cuja presença é importante do ponto de vista do controle de deteriorantes. Dois métodos padronizados estão disponíveis: o método ISO 13720:1995 para carnes e produtos cárneos e o método ISO/TS 11059:2009 para leite e produtos lácteos. Os dois métodos são de contagem padrão em placas, usando meios seletivos e incubação a 25ºC. Todas as colônias são consideradas suspeitas e a confirmação é feita verificando se o metabolismo é estritamente respiratório e se há podução de citocromo oxidase.

Para o plaqueamento, a ISO 13720:1995 recomenda o Ágar Cetrimida Fucidina Cefaloridina (CFC), cuja base contém cloreto de magnésio e sulfato de potássio, para estimular a produção do pigmento piocianina. Os agentes seletivos são a cefaloridina (antibiótico do grupo das cefalosporinas) para inibir bactérias em geral, particularmente enterobactérias, estafilocos e estreptococos, a fucidina (da família dos antibióticos fusidanos), para inibir *Acinetobacter* e *Moraxella*

e a cetrimida, para inibir leveduras. A ISO 11059:2009 recomenda o Ágar Penicilina Pimaricina (PPA), cuja base, idêntica à do CFC, também contém cloreto de magnésio e sulfato de potássio, para estimular a produção do pigmento piocianina. Os agentes seletivos são a penicilina, para inibir bactérias em geral, e a pimaricina, também chamada natamicina, que é um antibiótico antifúngico.

São raros os trabalhos que relatam se as cepas transferidas para os novos gêneros crescem nas condições dos métodos ISO 13720 e 11059. Segundo Jeppesen & Jeppesen (2003), *S. putrefaciens* é parcialmente inibida no Ágar CFC. Tryfinopoulou *et al.* (2001), entretanto, relatam crescimento dessa espécie em CFC.

Na análise de água, a legislação brasileira só estabelece padrão para *P. aeruginosa* em água mineral e água natural engarrafada (Resolução RDC 275/2005), não sendo comum a contagem de *Pseudomonas* sp em outros tipos de água de consumo humano. Para a contagem de *P. aeruginosa*, a técnica mais simples é a dos tubos múltiplos, para determinação do número mais provável (NMP). Nas amostras em que se espera ausência ou baixas contagens (menor do que 10/ml), recomenda-se distribuir 10 porções de 10ml da amostra, em 10 tubos contendo 10ml do caldo de cultura, em concentração dupla, totalizando 100ml de amostra, como é requerido pela legislação brasileira. Para amostras em que seja esperada uma concentração maior dos microrganismos, recomenda-se trabalhar com diluições, inoculando-se uma série de 5 tubos para cada diluição. O teste presuntivo é feito em Caldo Asparagina, meio seletivo no qual a asparagina é a única fonte de carbono e nitrogênio disponível para crescimento. O teste presuntivo é considerado positivo quando ocorre crescimento (turvação do meio) e produção de um pigmento esverdeado, fluorescente sob luz ultravioleta (365nm, luz negra). Para a confirmação é utilizado o Ágar ou Caldo Acetamida, meio diferencial para *P.aeruginosa*, no qual a acetamida é a única fonte de carbono e nitrogênio. A utilização da acetamida resulta numa alcalinização do meio, visualizada através da viragem do indicador vermelho de fenol, de vermelho para "pink".

24.2. CONTAGEM DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM ÁGUA MÉTODO DOS TUBOS MÚLTIPLOS (NMP)

Método da 21º Edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Hunt & Rice, 2005).

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 4, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos pelo NMP, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

24.2.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

- Pipetas de 10ml para transferência dos volumes
- Tubos com 10ml Caldo Asparagina em concentração dupla para inoculação de 10ml da amostra
- Tubos com 10ml Caldo Asparagina em concentração simples para inoculação de 1ml da amostra ou das diluições
- Água de diluição (Tampão Fosfato com cloreto de magnésio)
- Tubos com Ágar ou Caldo Acetamida para confirmação
- Estufa incubadora regulada a 35-37°C

24.2.2. PROCEDIMENTO

O procedimento para contagem de *P. aeruginosa* pelo método dos tubos múltiplos encontra-se descrito na Figura 24.1.

a) Preparação da amostra

Homogeneizar a amostra por agitação, invertendo o frasco 25 vezes em ângulo de 45º.

b) Teste presuntivo

Com uma pipeta de 10 ou 25ml, adicionar 10 porções de 10ml da amostra em 10 tubos contendo 10ml de Caldo Asparagina, em concentração dupla. Incubar os tubos a 35-37ºC/24h e observar se há ocorrência de crescimento e produção de um pigmento verde fluorescente sob luz

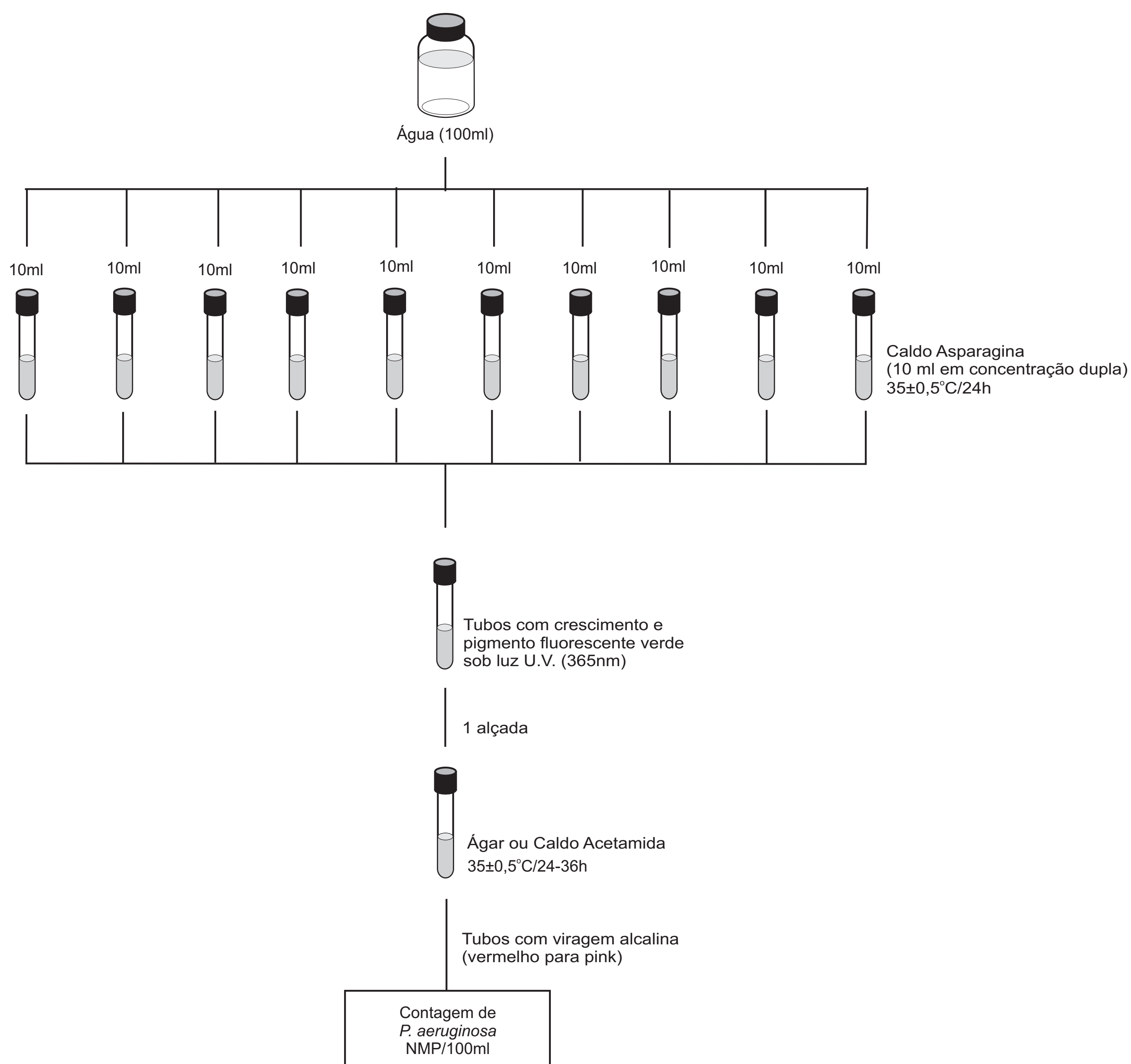


Figura 24.1. Esquema de análise para contagem de *P. aeruginosa* pelo método dos tubos múltiplos (Hunt & Rice, 2005).

ultravioleta (365nm, luz negra). Em caso positivo passar aos itens subseqüentes. Em caso negativo, reincubar até completar 48 horas e repetir a leitura, passando para os itens subseqüentes em caso de crescimento com produção do pigmento. A não ocorrência de crescimento e/ou produção de pigmento após 48 horas de incubação indica ausência de *Pseudomonas aeruginosa* nos 100ml da amostra.

Nota b.1) A inoculação de 10 porções de 10ml da amostra é o procedimento padrão para análise de amostras de água destinadas ao consumo humano, nas quais se espera ausência. No caso da análise de outros tipos de água, nas quais a população possa atingir contagens superiores, recomenda-se trabalhar com diluições, inoculando-se uma série de cinco tubos para cada diluição. Nesse caso, as diluições devem ser preparadas utilizando-se como diluente a água de diluição (Tampão Fosfato com cloreto de magnésio) e a seleção das diluições depende da contagem estimada na amostra. Por exemplo, para amostras com contagem estimada na faixa de 3 a 1.000/ml, as diluições recomendadas são 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}. Havendo suspeita de contagens acima dessa faixa, deve-se inocular diluições maiores e, nos casos em que não seja possível fazer uma estimativa prévia da concentração, recomenda-se inocular um número maior de diluições, cobrindo uma faixa mais ampla. Na preparação das diluições e inoculação dos tubos, utilizar pipetas com capacidade de, no máximo, 10% dos volumes a serem transferidos.

c) Teste confirmativo

A partir de cada tubo positivo de Caldo Asparagina, transferir uma alçada da cultura para tubos com Caldo ou Ágar Acetamida inclinado e incubar os tubos a 35-37°C/24-36h. Observar com 24h se há ocorrência de crescimento com viragem alcalina do indicador, mudando a cor do meio de vermelho para "pink". Em caso negativo, reincubar os tubos e repetir a leitura com 36h.

d) Cálculo dos resultados

Considerar como *P. aeruginosa* todas as culturas com viragem alcalina no Agar Acetamida. Determinar o Número Mais Provável (NMP) de acordo com as orientações do capítulo 4.

24.3. MÉTODO ISO 13720:1995
Contagem de *Pseudomonas* spp em carne e produtos cárneos

Método de contagem em placas da International Standards Organization (ISO 13720, 1995) para contagem de *Pseudomonas* spp em carne e produtos cárneos.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

24.3.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparação da amostra e diluições

- Diluente: Água Peptonada Tamponada (BPW) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada Tamponada (BPW) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Observação**:** consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem de *Pseudomonas* spp

- Placas de Ágar Cetrimida Fucidina Cefaloridina (CFC)
- Placas de Ágar Nutriente
- Reagente de Kovaks para teste de oxidase
- Tubos de Ágar Kligler Ferro (KIA)
- Estufa incubadora regulada a 25±1ºC com termômetro calibrado

24.3.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem de *Pseudomonas* spp em carne e produtos cárneos encontra-se descrito na Figura 24.2.

a) Preparação das amostras, inoculação e incubação

Para a preparação das amostras e diluições decimais seriadas, seguir as recomendações do Capítulo 2. Selecionar pelo menos duas diluições adequadas da amostra e inocular em placas de Ágar Cetrimida Fucidina Cefaloridina (CFC), plaqueamento em superfície. Aguardar que as placas sequem e incubar a 25±1ºC/48h.

> **Nota a.1)** O método ISO 13720:1995 especifica plaqueamento em duplicata, mas a ISO 7218:2007 já não exige a duplicata na contagem em placas, se for feita a inoculação de pelo menos duas diluições.

b) Confirmação das colônias

Selecionar placas com 15 a 300 colônias e, de cada placa, escolher cinco colônias, ao acaso, para a confirmação. Se houver menos de cinco em alguma placa, selecionar todas.

A partir de cada colônia selecionada, inocular uma alçada da cultura (estrias de esgotamento) em uma placa de Agar Nutriente (NA) e incubar as placas a 25±1ºC/24h. Selecionar uma colônia bem isolada para os testes de confirmação descritos abaixo.

b.1) Teste de oxidase. Colocar um disco ou fita de papel de filtro no interior de uma placa de Petri e embeber o centro do papel com o reagente de Kovacs para teste de oxidase (solução aquosa 1% de cloridrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina). Com uma alça de platina ou palitos estéreis (não utilizar alça de níquel-cromo), remover uma pequena quantidade da cultura em NA e espalhar sobre o reagente no papel, observando se ocorre o desenvolvimento de uma cor azul intensa, em aproximadamente dez segundos (teste positivo). O não-desenvolvimento da cor azul no intervalo de dez segundos indica teste negativo.

b.2) Teste de crescimento em Ágar Kligler Ferro (KIA). Com uma agulha de inoculação, inocular cada cultura em um tubo inclinado de KIA, por picada e estrias na rampa. Incubar os tubos a 25±1ºC/24h, com as tampas ligeiramente afrouxadas, para manter condições aeróbicas. Culturas com crescimento na rampa e não crescimento no fundo (aeróbias estritas) podem ser consideradas como *Pseudomonas* spp.

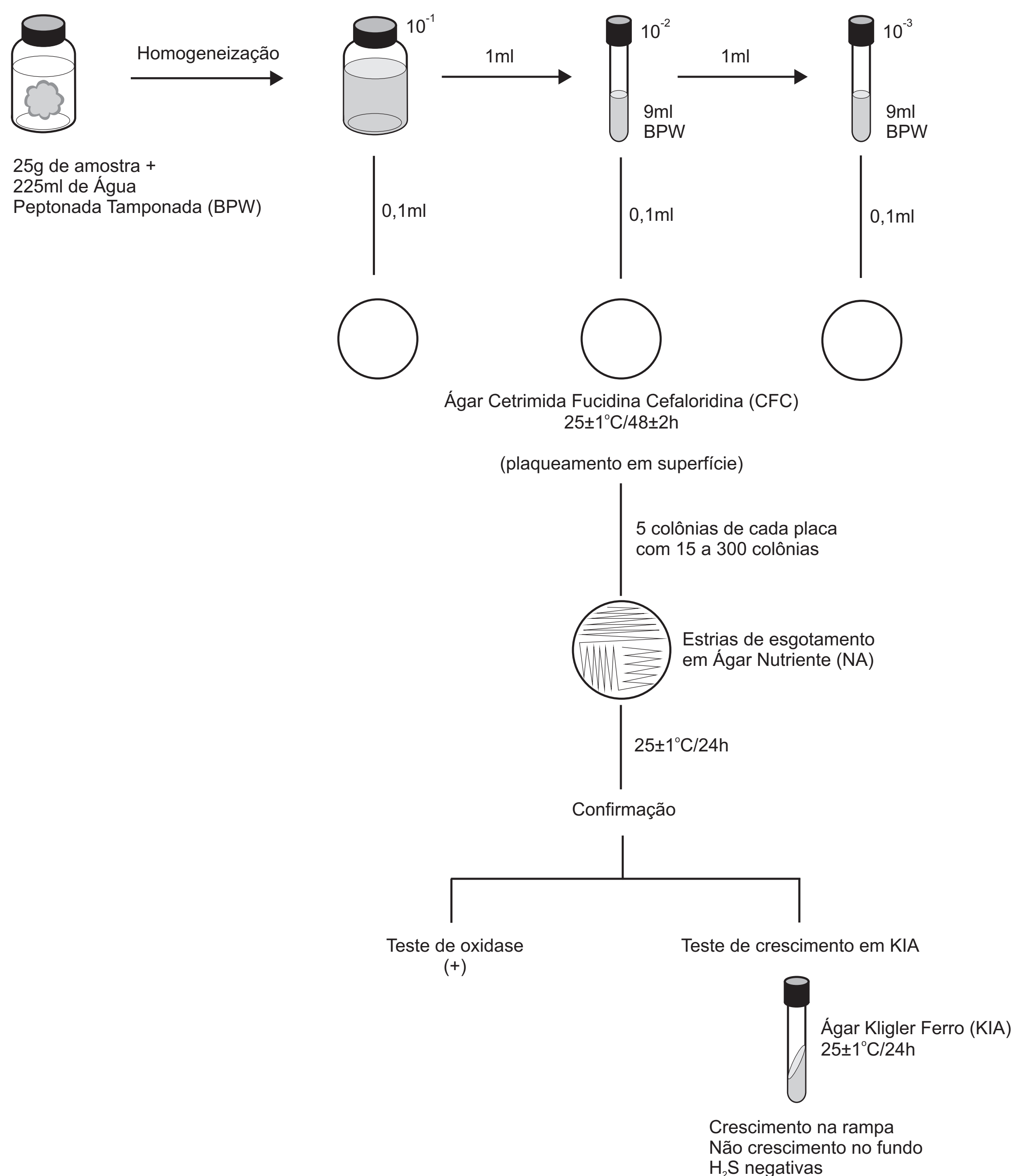


Figura 24.2. Esquema de análise para contagem de *Pseudomonas* spp em carne e produtos cárneos, pelo método ISO 13720 (1995).

c) Cálculo dos resultados

Considerar como confirmadas todas as culturas oxidase positivas com crescimento na rampa, mas não no fundo do tubo de KIA (aeróbias estritas). Seguir as regras abaixo para o cálculo dos resultados.

Nota c1) Na descrição do gênero *Pseudomonas* o teste de oxidase pode ser positivo ou negativo. O método descrito acima não considera as cepas oxidase negativas no cálculo dos resultados.

Regra 1 – Geral. Selecionar para os cálculos as placas com 15 a 300 colônias. Em primeiro lugar, calcular o número total de colônias de *Pseudomonas* em cada placa da qual foram tomadas colônias para confirmação (todas as placas com 15 a 300 colônias). Esse número é função do número total de colônias contadas e da percentagem de colônias confirmadas. Por exemplo, numa placa com 150 colônias, cinco submetidas à confirmação e quatro confirmadas (80%), o número de colônias de *Pseudomonas* é 150x0,8 = 120.

Em segundo lugar, calcular o número de UFC (unidades formadoras de colônias) por grama ou mililitro da amostra. Esse valor é igual à soma das colônias de *Pseudomonas* em todas as placas com 15 a 300 colônias, dividido pela soma da quantidade de amostra inoculada nessas placas (Exemplos 1 e 2).

Exemplo 1) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	150	17	2
Colônias submetidas à confirmação	5	5	2
Colônias confirmadas	4 (80%)	3 (60%)	2 (100%)
Colônias de *Pseudomonas*	150x0,8 = 120	17x0,6 = 10	2x1 = 2
Quantidade de amostra inoculada	$0,1x10^{-1}$	$0,1x10^{-2}$	$0,1x10^{-3}$
Soma das colônias	120+10+2 = 132		
Soma das quantidades inoculadas	$0,1x10^{-1} + 0,1x10^{-2} + 0,1x10^{-3}$ = 0,0111		
UFC/g ou ml	132/0,0111 = 11.891,89 = 11.892 = $1,2x10^{4}$		

Exemplo 2) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, duas placas por diluição (duplicata). Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}		Diluição 10^{-2}		Diluição 10^{-2}	
Total de colônias	130	142	12	15	0	2
Colônias submetidas à confirmação	5	5	5	5	0	2
Colônias confirmadas	3 (60%)	3 (60%)	3 (60%)	4 (80%)	0	1 (50%)
Colônias de *Pseudomonas*	78	85	7	12	0	1
Soma das colônias	78+85+7+12+1 = 183					
Soma das quantidades inoculadas	$2x0,1x10^{-1} + 2x0,1x10^{-2} + 0,1x10^{-3}$ = 0,0221					
UFC/g ou ml	183/0,0221 = 8.280,54 = 8.281 = $8,2x10^{3}$					

Regra 2 – Número de colônias menor do que 15. Se em nenhuma placa da primeira diluição o número total de colônias chegou a 15, calcular o resultado, mas relatar como contagem estimada (exemplo 3).

Exemplo 3) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	12	0	0
Colônias submetidas à confirmação	5	0	0
Colônias confirmadas	4 (80%)	0	0
Colônias de *Pseudomonas*	12x0,8 = 10	0	0
Quantidade de amostra inoculada	$0,1x10^{-1}$ = 0,01	não considerada	não considerada
UFC/g ou ml	10/0,01 = 1.000 = $1,0x10^{3}$ (est)*		

*Contagem estimada.

Regra 3 – Nenhuma colônia. Se em nenhuma placa foi observado crescimento, calcular o resultado de uma colônia e relatar como "menor do que o valor obtido" (exemplo 4).

Exemplo 4) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	0	0	0
Colônias submetidas à confirmação	0	0	0
Colônias confirmadas	0	0	0
Colônias de *Pseudomonas*	0	0	0
Quantidade de amostra inoculada	$0,1x10^{-1}$ = 0,01	não considerada	não considerada
UFC/g ou ml	<1/0,01 = <100 = $<1,0x10^{2}$		

Regra 4 – mais de 300 colônias. Há duas situações a considerar.

4.1) Se o número de colônias nas placas de uma diluição for maior do que 300 e houver colônias confirmadas como *Pseudomonas* spp, mas na diluição seguinte, com menos de 300 colônias, nenhuma colônia selecionada for confirmada, calcular o resultado de uma colônia em cada diluição, separadamente, e relatar o resultado como "entre os valores obtidos" (Exemplo 5).

4.2) Se o número de colônias nas placas de uma diluição for maior do que 300 e na diluição seguinte menor do que 300, mas em nenhuma das duas diluições houver colônias confirmadas como *Pseudomonas* spp, calcular o resultado de uma colônia na maior diluição e relatar o resultado como "menor do que o valor obtido" (Exemplo 6).

Exemplo 5) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	>300	30	3
Colônias submetidas à confirmação	5	5	0
Colônias confirmadas	2 (40%)	0	não determinado
Colônias de *Pseudomonas*	315x0,4 = 126	0	não determinado
UFC/g ou ml	>1/$0,1x10^{-1}$ = >100	<1/$0,1x10^{-2}$ = <1.000	não considerada
	entre $1,0x10^{2}$ e $1,0x10^{3}$		

Exemplo 6) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	>300	30	3
Colônias submetidas à confirmação	5	5	0
Colônias confirmadas	0	0	não determinado
Colônias de *Pseudomonas*	0	0	não determinado
UFC/g ou ml	não considerada	<1/$0,1x10^{-2}$ = <1.000 = $<1,0x10^{3}$	não considerada

24.4. MÉTODO ISO/TS 11059:2009
Contagem de *Pseudomonas* spp em leite e produtos lácteos

Método de contagem em placas da International Standards Organization (ISO/TS 11059, 2009) para contagem de *Pseudomonas* spp em leite e produtos lácteos.

Antes de iniciar as atividades, ler atentamente as orientações do Capítulo 3, que apresenta todos os detalhes e cuidados envolvidos na contagem de microrganismos em placas, da seleção das diluições ao cálculo dos resultados. O procedimento descrito abaixo não apresenta esses detalhes, pressupondo que sejam conhecidos pelo analista.

24.4.1. MATERIAL REQUERIDO PARA A ANÁLISE

Preparação da amostra e diluições

- Diluente: Água Peptonada Tamponada (BPW) ou Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Tubos de diluição com 9ml de Água Peptonada Tamponada (BPW) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB)
- Observação: consultar o Anexo 2.2 do Capítulo 2 para verificar casos especiais em que o tipo ou volume de diluente variam em função da amostra analisada.

Contagem de *Pseudomonas* spp

- Ágar Penicilina Pimaricina (PPA)
- Placas de Ágar Nutriente
- Reagente de Kovaks para teste de oxidase
- Tubos de Ágar Glicose (não inclinados)
- Estufa incubadora regulada a 25±1°C com termômetro calibrado

24.4.2. PROCEDIMENTO

O esquema geral de análise para contagem de *Pseudomonas* spp em leite e produtos lácteos pelo método ISO/TS 11059:2009 encontra-se descrito na Figura 24.3.

a) Preparação das amostras, inoculação e incubação

Para a preparação das amostras e diluições decimais seriadas, seguir as recomendações do Capítulo 2. Selecionar pelo menos duas diluições adequadas da amostra e inocular em placas de Ágar Penicilina Pimaricina (PPA), plaqueamento em superfície. Aguardar que as placas sequem e incubar, sem inverter, a 25±1°C/48±2h.

b) Confirmação das colônias

Selecionar placas com até 150 colônias e, de cada placa, escolher cinco colônias, ao acaso, para a confirmação. Se houver menos de cinco em alguma placa, selecionar todas.

A partir de cada colônia selecionada, inocular uma alçada da cultura (estrias de esgotamento) em uma placa de Agar Nutriente (NA) e incubar as placas a 25±1°C/24-48h. Selecionar uma colônia bem isolada para os testes de confirmação descritos abaixo.

b.1) Teste de oxidase. Da mesma forma descrita no item 24.3.2.b.1.

b.2) Teste de fermentação da glicose. Com uma agulha de inoculação, inocular cada cultura em um tubo de Ágar Glicose (não inclinado), por picada. Incubar os tubos a 25+1ºC/ 24±3h, com as tampas ligeiramente afrouxadas, para manter condições aeróbicas. Crescimento sem alteração da cor do meio para amarelo (sem viragem ácida do indicador) é indicativo de não fermentação da glicose. Algumas cepas podem desenvolver cor amarela na superfície do meio de cultura, mas isso não indica fermentação, é causado pela oxidação da glicose.

c) Cálculo dos resultados

Considerar como confirmadas todas as culturas oxidase positivas que não fermentam a glicose. O cálculo do número de UFC/g ou ml é feito da mesma forma descrita no método ISO 13720:1995 (item 24.3.c), mas o limite superior aceitável mudou de 300 para 150 colônias.

Nota c1) Na descrição do gênero *Pseudomonas* o teste de oxidase pode ser positivo ou negativo. O método descrito acima não considera as cepas oxidase negativas no cálculo dos resultados.

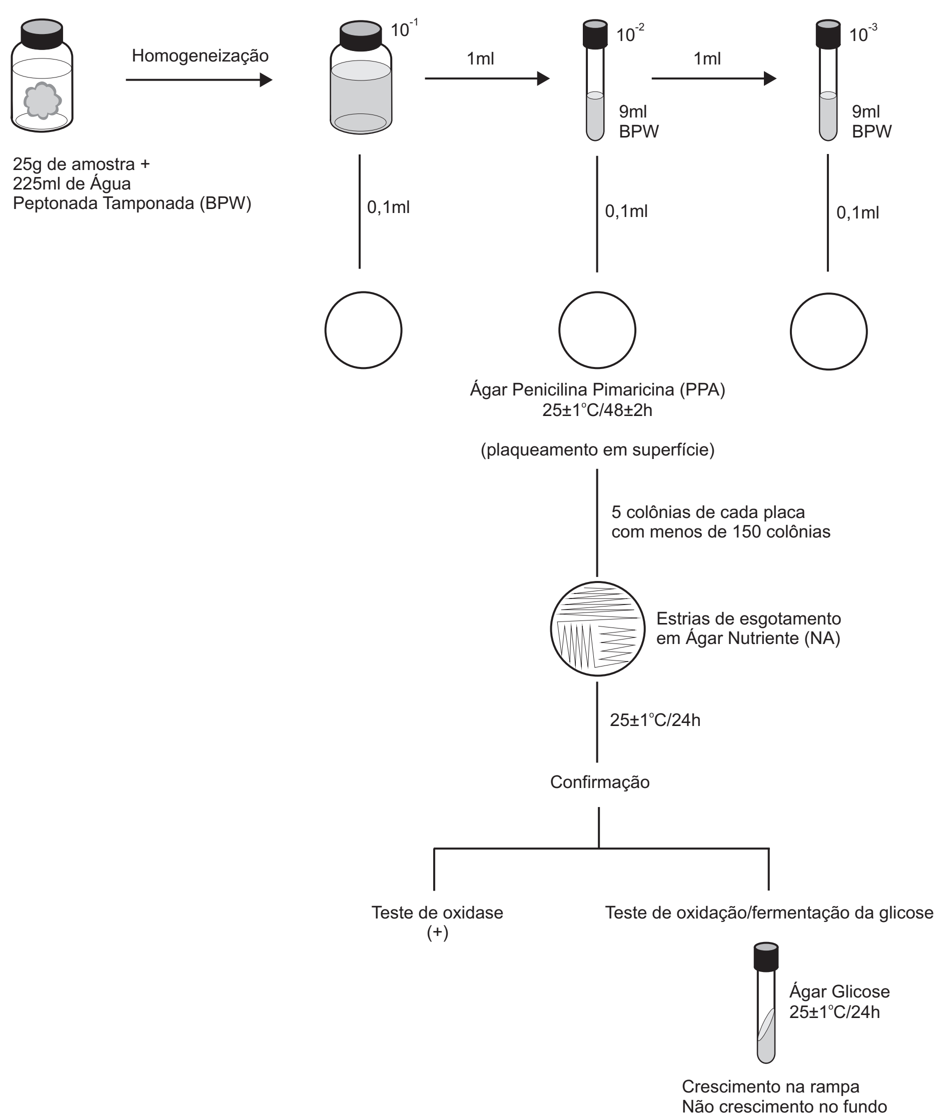


Figura 24.3. Esquema de análise para contagem de *Pseudomonas* spp em leite e produtos lácteos, pelo método ISO/TS 11059:2009.

Regra 1 – Geral. Selecionar para os cálculos as placas com 15 a 150 colônias. Em primeiro lugar, calcular o número total de colônias de *Pseudomonas* em cada placa da qual foram tomadas colônias para confirmação (todas as placas com 15 a 150 colônias). Esse número é função do número total de colônias contadas e da percentagem de colônias confirmadas. Por exemplo, numa placa com 150 colônias, cinco submetidas à confirmação e quatro confirmadas (80%), o número de colônias de *Pseudomonas* é 150x0,8 = 120.

Em segundo lugar, calcular o número de UFC (unidades formadoras de colônias) por grama ou mililitro da amostra. Esse valor é igual à soma das colônias de *Pseudomonas* em todas as placas com 15 a 300 colônias, dividido pela soma da quantidade de amostra inoculada nessas placas (Exemplo 1).

Exemplo 1) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	150	17	2
Colônias submetidas à confirmação	5	5	2
Colônias confirmadas	4 (80%)	3 (60%)	2 (100%)
Colônias de *Pseudomonas*	150x0,8 = 120	17x0,6 = 10	2x1 = 2
Quantidade de amostra inoculada	$0,1x10^{-1}$	$0,1x10^{-2}$	$0,1x10^{-3}$
Soma das colônias	120+10+2 = 132		
Soma das quantidades inoculadas	$0,1x10^{-1} + 0,1x10^{-2} + 0,1x10^{-3} = 0,0111$		
UFC/g ou ml	$132/0,0111 = 11.891,89 = 11.892 = 1,2x10^{4}$		

Regra 2 – Número de colônias menor do que 15. Se em nenhuma placa da primeira diluição o número total de colônias chegou a 15, calcular o resultado, mas relatar como contagem estimada (exemplo 2).

Exemplo 2) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	12	0	0
Colônias submetidas à confirmação	5	0	0
Colônias confirmadas	4 (80%)	0	0
Colônias de *Pseudomonas*	12x0,8 = 10	0	0
Quantidade de amostra inoculada	$0,1x10^{-1} = 0,01$	não considerada	não considerada
UFC/g ou ml	$10/0,01 = 1.000 = 1,0x10^{3}$ (est)*		

*Contagem estimada.

Regra 3 – Nenhuma colônia. Se em nenhuma placa foi observado crescimento, calcular o resultado de uma colônia e relatar como "menor do que o valor obtido" (exemplo 3).

Exemplo 3) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	0	0	0
Colônias submetidas à confirmação	0	0	0
Colônias confirmadas	0	0	0
Colônias de *Pseudomonas*	0	0	0
Quantidade de amostra inoculada	$0{,}1x10^{-1} = 0{,}01$	não considerada	não considerada
UFC/g ou ml	$<1/0{,}01 = <100 = <1{,}0x10^{2}$		

Regra 4 – mais de 150 colônias. Há duas situações a considerar.

4.1) Se o número de colônias nas placas de uma diluição for maior do que 150 e houver colônias confirmadas como *Pseudomonas* spp, mas na diluição seguinte, com menos de 150 colônias, nenhuma colônia selecionada for confirmada, calcular o resultado de uma colônia em cada diluição, separadamente, e relatar o resultado como "entre os valores obtidos" (Exemplo 4).

4.2) Se o número de colônias nas placas de uma diluição for maior do que 150 e na diluição seguinte menor do que 150, mas em nenhuma das duas diluições houver colônias confirmadas como *Pseudomonas* spp, calcular o resultado de uma colônia na maior diluição e relatar o resultado como "menor do que o valor obtido" (Exemplo 5).

Exemplo 4) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	>150	30	3
Colônias submetidas à confirmação	5	5	0
Colônias confirmadas	2 (40%)	0	não determinado
Colônias de *Pseudomonas*	150x0,4 = 60	0	não determinado
UFC/g ou ml	$>1/0{,}1x10^{-1} = >100$	$<1/0{,}1x10^{-2} = <1.000$	não considerada
	entre $1{,}0x10^{2}$ e $1{,}0x10^{3}$		

Exemplo 5) Inoculados 0,1ml das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}, uma placa por diluição. Os resultados obtidos foram:

	Diluição 10^{-1}	Diluição 10^{-2}	Diluição 10^{-3}
Total de colônias	>150	30	3
Colônias submetidas à confirmação	5	5	0
Colônias confirmadas	0	0	não determinado
Colônias de *Pseudomonas*	0	0	não determinado
UFC/g ou ml	não considerada	$<1/0{,}1x10^{-2} = <1.000 = <1{,}0x10^{3}$	não considerada

24.5. REFERÊNCIAS

ANZAI, Y., KIM, H., PARK, J. Y., WAKABAYASHI, H., OYAIZU, H., 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50**:1563–1589.

CLAYDON, T. J., HAMMER, B. W., 1939. A skunk-like odor of bacterial origin in butter. **J. Bacteriol. 37**:251–258.

EUZÉBY, J.P., 2004. *Janthinobacterium, Janthinobacterium lividum.* In: **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire Online**. Disponível em http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/jj/janthinobacterium.html, acesso em 08/01/2010.

EUZÉBY, J. P., 2006. *Pseudomonadales*, *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas*. In: **Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire Online**. Disponível em http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/pp/pseudomonadales.html, acesso em 08/01/2010.

EUZÉBY, J. P., 2010. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível no site http://www.bacterio.cict.fr/, acesso em 08/01/2010.

GARRITY, G. M., BRENNER, D. J., KRIEG, N.R., STALEY, J.T. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed., Volume 2 – The Proteobacteria**. New York: Springer Science+Business Media, 2005.

HUNT, M.E. & RICE, E.W. Microbiological examination. In: EATON *et al.* (Eds), **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed**. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 2000. **Microorganisms in Foods 6 – Microbial Ecology of Food Commodities**. Gaithersburg, Maryland, U.S.A.

ISO 13720. **Meat and meat products - Enumeration of *Pseudomonas* spp, 1st ed**. The International Organization for Standardization, 1995.

ISO/TS 11059. **Milk and milk products - Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp, 1th ed**. The International Organization for Standardization, 2009.

JEPPESEN, V. F., JEPPESEN, C., 2003. Media for *Pseudomonas* spp. and related genera from food and enviromental samples. In: JANET, E. L., CORRY, G. D. W., CURTIS, R., BAIRD, M. **Handobook of Culture Media for Food Microbiology, 2nd Ed., Volume 34, Chapter 20, p. 345-368. Elsevier, 2003.**

KÄMPFER, P., FALSEN, E., BUSSE, H. J., 2008. Reclassification of *Pseudomonas mephitica* Claydon and Hammer 1939 as a later heterotypic synonym of *Janthinobacterium lividum* (Eisenberg 1891) De Ley *et al.* 1978**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58**:136–138.

KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1st Ed. Vol. I**. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.

PALLERONI, N. J., BRADBURY, J. F., 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. **Int. J. Syst. Bacteriol. 43**:606-609.

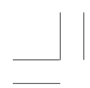
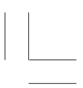
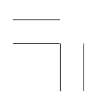
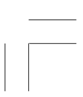
PORTARIA Nº 518 de 25 de março de 2004, Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. D.O.U. - **Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 26 de março de 2004**.

RESOLUÇÃO RDC Nº 274 de 22 de setembro de 2005, ANVISA. **Aprova o "Regulamento Técnico para Águas Envasadas e Gelo**". D.O.U. - **Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005**.

RESOLUÇÃO RDC Nº 275 de 22 de setembro de 2005 ANVISA. Aprova o "Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural". **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005**.

TOMPKIN, R. B., McNAMARA, A. M., ACUFF, G. R. Meat and meat products. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed**. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 45, p.463-471.

TRYFINOPOULOU, P., DROSINOS, E. H., NYCHAS, G. J. E, 2001. Performance of *Pseudomonas* CFC-selective medium in the fish storage ecosystems. **Journal of Microbiological Methods, 47(2)**:243-247.

Capítulo 25

Preparação de material de laboratório para análises microbiológicas

A preparação do material de laboratório para utilização em análises microbiológicas envolve todas as atividades necessárias para garantir que os frascos, utensílios, instrumentos e vidraria, destinados ao contato com as amostras se encontrem totalmente limpos, estéreis e isentos de resíduos químicos e orgânicos, no momento das análises. Esse trabalho envolve as atividades de descontaminação, descarte de resíduos contaminados, lavagem, acondicionamento e esterilização.

25.1. DESCONTAMINAÇÃO E DESCARTE DE RESÍDUOS CONTAMINADOS

Todo o material resultante das análises microbiológicas é altamente contaminado, uma vez que os métodos analíticos promovem a multiplicação dos microrganismos presentes, elevando o seu número em vários milhares de vezes, em comparação com as contagens normalmente encontradas nas amostras. Esse material inclui não apenas os meios de cultura, onde foi obtido crescimento microbiano, mas também toda a vidraria e demais utensílios que tenham entrado em contato com os microrganismos.

Procedimento para a descontaminação

Submeter todo o material à esterilização em autoclave, a 121°C por 30min (ISO 7218:2007), observando-se os seguintes cuidados:

- afrouxar as tampas de todos os frascos e a boca dos sacos de esterilização, para que haja livre acesso do vapor (ISO 7218:2007);
- adicionar água ou solução detergente aos estojos de descarte de pipetas, para amolecer os resíduos e facilitar a posterior remoção.

25.2. LAVAGEM

A lavagem da vidraria e demais utensílios é uma etapa fundamental no preparo do material de laboratório, principalmente quanto à escolha dos detergentes e aos métodos de enxágüe, para remover os resíduos desses agentes.

Os detergentes mais utilizados são os aniônicos, principalmente aqueles que contêm compostos alcalinos como os silicatos, carbonatos ou fosfatos. Eventualmente, pode ser necessária a aplicação de um agente mais forte, principalmente para a limpeza de utensílios que não permitem a introdução de escovas (como pipetas, por exemplo), ou para a remoção de resíduos mais resistentes à ação dos detergentes. Nesses casos, pode ser utilizada a solução alcoólica 1N de hidróxido de sódio.

O enxágüe dos utensílios deve ser feito de forma a garantir a completa remoção dos resíduos de detergente ou solução alcoólica de hidróxido de sódio utilizados. Os resíduos desses compostos podem interferir com os resultados das análises, tanto por alteração das características dos meios de cultura, como por inibição do crescimento dos microrganismos. Como detergentes e soluções de limpeza apresentam uma forte afinidade pelas superfícies da vidraria e demais utensílios (razão pela qual são eficientes no deslocamento da sujeira), sua completa remoção exige seis a doze enxágües sucessivos em água corrente, seguidos de um a vários enxágües em água destilada.

Procedimento para a lavagem

a) Remover todo o material descontaminado presente nos frascos e utensílios, antes de iniciar a lavagem. Meios de cultura sólidos devem ser removidos das placas com uma espátula e, quando contidos em tubos e outros frascos de boca estreita, devem ser aquecidos, fundidos e vertidos na pia.

b) Mergulhar todo o material em solução detergente e deixar de molho por duas horas ou um pouco mais, dependendo do grau de aderência do material a ser removido. Fazer uma pré-lavagem dos frascos e utensílios em água corrente, para evitar a introdução de excesso de matéria orgânica nas bacias de lavagem (esse material pode deteriorar-se e desenvolver odor desagradável na água do molho). Os tubos de Durhan devem ser colocados de molho em frasco separado, resistente ao calor, e submetidos à ação do vapor fluente por 15 minutos, para remoção dos resíduos de meio de cultura. As pipetas devem ter o algodão do bocal removido antes do período de permanência de molho. Para a preparação da solução detergente, deve-se seguir as recomendações do fabricante do detergente aplicado.

c) Com o auxílio de escovas e esponjas, esfregar os frascos e demais utensílios, lembrando de remover também as anotações de lápis e canetas dermatográficas e vidrográficas. Não conseguindo uma boa limpeza (principalmente do material que não pode ser esfregado com escovas), mergulhar em solução alcoólica 1N de NaOH e deixar de molho por alguns minutos a algumas horas, dependendo da aderência do material a ser removido. Proteger as mãos com luvas de borracha e utilizar pinças de aço inoxidável para manusear o material de molho em solução de NaOH.

c.1) Preparo da solução alcoólica 1N de hidróxido de sódio. Adicionar e dissolver, aos poucos e cuidadosamente, 40g de NaOH em um béquer com 100ml de água destilada, colocado dentro de um banho de água fria. **Cuidado:** A dissolução da soda libera uma quantidade significativa de calor e a solução obtida é extremamente caústica. Aguardar o resfriamento e completar o volume para 1 litro com etanol 96%.

d) Enxaguar todo o material em água corrente, por dez vezes sucessivas, enchendo e esvaziando totalmente os frascos. Enxaguar em seguida com água destilada ou deionizada pelo menos uma vez (ISO 7218:2007). No caso de pipetas, recomenda-se recorrer ao auxílio de um lavador de pipetas, mantendo cada batelada sob enxágüe contínuo, por pelo menos uma hora.

25.3. ACONDICIONAMENTO

Atenção: as recomendações deste item, bem como as do 25.4 (esterilização), referem-se aos frascos e utensílios vazios. Material com meios de cultura, diluentes e reagentes devem ser preparados, acondicionados e esterilizados seguindo as orientações do Capítulo 26 e anexo 1.

Procedimentos para o acondicionamento

a) Placas de Petri. Devem ser acondicionadas em estojos porta-placas de alumínio ou aço inoxidável, em grupos de mesma dimensão, ou embrulhadas em papel kraft, em grupos de até 10 placas.

b) Pipetas. Preencher o bocal com o algodão e acondicionar em estojos porta-pipetas de alumínio ou aço inoxidável, em grupos de mesma capacidade, com as pontas para baixo, na extremidade oposta à da tampa do estojo. Proteger o fundo dos estojos com um chumaço de gaze ou algodão, para evitar danos às pontas das pipetas. Alternativamente, embrulhar individualmente em papel kraft, lembrando-se de identificar a extremidade do embrulho que deve ser aberta no momento da análise.

c) Tubos de ensaio vazios. Tampar com tampão de algodão ou com as respectivas tampas, no caso de tubos rosqueáveis. Acondicionar em grupos, em cestas apropriadas para esse fim, lembrando-se de afrouxar as tampas dos tubos de rosca. Cobrir a parte superior dos tubos com papel kraft e amarrar com barbante.

d) Frascos de homogeneização e outros frascos vazios tampados com tampão de algodão. Cobrir a tampa ou o tampão com papel kraft e amarrar com barbante, individualmente.

e) Espátulas, pinças, tesouras e demais utensílios. Embrulhar individualmente em papel kraft, lembrando-se de identificar a extremidade do embrulho que deve ser aberta no momento da análise.

25.4. ESTERILIZAÇÃO

Todo o material de laboratório vazio (placas, pipetas, tubos de ensaio, frascos, pinças, tesouras, etc.) pode ser esterilizado tanto em autoclave quanto em estufa de esterilização.

Procedimentos para a esterilização

Na esterilização em estufa, o material deve permanecer a 170°C/1h e, na esterilização em autoclave, a 121°C/15 minutos (ISO 7218:2007). Não trabalhar com as estufas ou autoclaves muito cheias, para facilitar a transferência de calor. Observações práticas:

a) A esterilização de vidraria em estufas é preferida, nos laboratórios de microbiologia, porque, ao final da esterilização, o material encontra-se completamente seco, pronto para uso, dispensando a permanência em estufas de secagem. Entretanto, atenção: pipetas com capacidade menor do que 1,0ml não devem ser esterilizadas em estufas, pois as altas temperaturas provocam alterações significativas nas medidas de volume. O procedimento correto é esterilizar em autoclaves a 121°C, por não mais do que 15 minutos.

b) Todos os tubos de ensaio, frascos e estojos devem ser esterilizados com as tampas afrouxadas ou ligeiramente abertas, para que haja livre acesso do vapor ou ar quente no interior (ISO 7218:2007). Após o término da esterilização essas tampas devem, então, ser completamente fechadas.

c) Na esterilização de vidraria vazia em autoclave, é recomendável liberar o vapor imediatamente após o término do tempo de esterilização, através da válvula de descarga de vapor. Esse cuidado diminui o acúmulo de condensado e facilita a secagem do material, porém, atenção: essa prática é recomendada para frascos vazios. No caso de meios de cultura, diluentes e reagentes, é necessário aguardar que a pressão baixe até zero, antes de descarregar o vapor, pois, em caso contrário, poderá ocorrer perda de líquido por evaporação.

d) Na esterilização de placas de Petri em autoclave, não é recomendável o acondicionamento em estojos, porque o acúmulo de condensado vai exigir, posteriormente, um período prolongado de permanência em estufas de secagem. Para diminuir esse problema, recomenda-se que as placas sejam embrulhadas em papel kraft, que além de absorver o condensado, seca rapidamente em estufas de secagem.

25.5. PREPARO DE VIDRARIA NOVA

Antes de ser colocada em uso, toda a vidraria nova deve ser preparada da seguinte forma:

a) Mergulhar e manter por 24 horas em água destilada.

b) Enxaguar em nova batelada de água destilada e submeter a um teste de pH, antes de ser utilizada.

c) Tampas de plástico ou borracha, de tubos de rosca ou outros frascos, devem passar por um tratamento para remoção de resíduos tóxicos. Para tanto, mergulhar em água destilada, autoclavar a 121°C/15 minutos e enxaguar em água destilada. Repetir este procedimento mais uma vez.

25.6. CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL

O material preparado deve ser inspecionado, para verificar se atende às exigências para uso em análises microbiológicas. Isso inclui a verificação da limpeza, a verificação da esterilização e a verificação da presença de resíduos tóxicos para os microrganismos.

25.6.1. VERIFICAÇÃO DA LIMPEZA

a) Fazer uma inspeção visual a cada uso.

b) Verificar diariamente o pH, após a lavagem e enxágüe, selecionando alguns frascos de material lavado (principalmente aquele submetido a tratamento com solução alcoólica de NaOH). Para verificar o pH, adicionar algumas gotas de solução 0,04% de azul de bromotimol, observando a cor. Em pH neutro, a solução mantém-se verde, em condições ácidas (pH 6,5 ou menor) ocorre viragem para amarelo e em condições alcalinas (pH 7,3 ou maior) ocorre viragem para azul. Alternativamente, pode-se utilizar tiras de papel indicador de pH.

b.1) Preparo da solução 0,04% de azul de bromotimol. Dissolver 0,1g de azul de bromotimol em 16 ml de solução 0,01N de NaOH e, em balão volumétrico, completar o volume para 250 ml com água destilada.

25.6.2. VERIFICAÇÃO DA ESTERILIZAÇÃO

Deve ser realizada através de indicadores químicos e biológicos, conforme recomendado na Resolução SS 374 da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, de 15/12/1995.

a) Indicadores químicos. Comprovam a exposição do artigo ao calor, embora não garantam que o mesmo esteja esterilizado. Devem ser utilizados em cada batelada, na forma de fitas ou selos adesivos indicadores, observando-se, a cada uso, se a fita ou selo indica a aplicação do calor.

b) Indicadores biológicos. Avaliam a eficácia da esterilização e devem ser aplicados pelo menos uma vez por semana, no primeiro ciclo de esterilização. No procedimento por calor úmido (autoclaves) deve-se utilizar fitas de papel impregnadas com esporos viáveis de *Geobacillus sthearothermophilus* ATCC 7953, na quantidade de 5x 10^5 a 5 x 10^6 esporos por fita (ou em ampolas

com a suspensão). Na esterilização por calor seco deve-se utilizar fitas impregnadas com esporos viáveis de *Bacillus subtilis* ATTC 9372, na quantidade de 5 x 10^6 esporos por fita (ou em ampolas com a suspensão). Dispor as fitas ou ampolas em diferentes posições do equipamento e, após a esterilização, incubar nas seguintes condições: *Geobacillus stearothermophilus* a 55°C/24-48h, *Bacillus subtilis* a 35º a 37ºC, leitura diária por até 7 dias.

25.6.3. VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS TÓXICOS

Deve ser feita periódicamente, principalmente quando se inicia o uso de uma nova marca de detergente para a lavagem. Para placas de Petri não descartáveis, preparar três grupos de placas da seguinte forma: **Grupo A:** Lavar seis placas da forma usualmente utilizada no laboratório. **Grupo B:** Lavar seis placas da maneira usualmente utilizada no laboratório e depois submeter a 12 enxágües adicionais, com 12 porções diferentes de água destilada. **Grupo C:** Lavar seis placas de Petri e deixar secar sem enxaguar a solução detergente.

Usar cada um destes grupos de placas para contar uma suspensão de *E. coli* ou *E. aerogenes,* por plaqueamento em profundidade, usando Ágar Padrão para Contagem (PCA), Ágar Nutriente (NA) ou Ágar Tripticase de Soja (TSA) como meio de contagem. Preparar as diluições e inocular, a cada uma das placas dos três grupos, 1 ml da diluição adequada para obtenção de 50 a 150 colônias nas placas. Para orientação, lembrar que uma suspensão de *E. coli,* com 24 horas em caldo nutriente, apresenta contagem entre 10^8 e 10^9/ml, de forma que o plaqueamento de 1 ml das diluições 10^{-5}, 10^{-6} e 10^{-7} provavelmente resultará em placas com um número adequado de colônias para contagem. Calcular a média do número de colônias desenvolvidas nas seis placas de cada grupo e comparar as médias obtidas:

Se a diferença entre as médias dos grupos A, B e C for menor do que 15%, significa que o detergente utilizado não apresenta ação tóxica contra os microrganismos.

Se a diferença entre as médias dos grupos A e C for maior ou igual a 15%, significa que o detergente apresenta efeito tóxico contra os microrganismos. Se a diferença entre os grupos A e B também for maior ou igual a 15%, significa que o método de enxágüe utilizado pelo laboratório não foi eficiente para remover completamente esses resíduos. Se, por outro lado, a diferença entre as médias A e B for menor do que 15%, significa que o método de lavagem e enxágüe utilizado pelo laboratório foi eficiente para remover os resíduos.

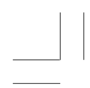
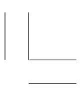
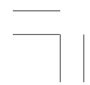
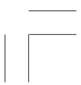
Para avaliar a presença de resíduos em tubos ou frascos, cultivar por 24 horas a 35°C uma cultura de *E. coli* ou *E. aerogenes*, inoculando a cultura em Caldo Nutriente (NB) ou Caldo Tripticase de Soja (TSB) acondicionado em três grupos de frascos, lavados da mesma forma recomendada para os grupos A, B e C de placas de Petri. Verificar a contagem das suspensões obtidas após a incubação, por contagem padrão em placas, e comparar os resultados de forma análoga à utilizada para as placas.

25.7. REFERÊNCIAS

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs –*General requirements and guidance for microbiological examination, 3rd ed.* The International Organization for Standardization, 2007.

NB (Norma Brasileira) 1295, 1990. *Lavagem, preparo e esterilização de materiais de laboratório de microbiologia.* Associação Brasileira de Normas Técnicas, maio de 1990.

Resolução SS 374 de 15/12/95. Altera a Norma Técnica sobre a organização do Centro de Material e Noções de Esterilização. *D.O.E.; Seção I; São Paulo – 16 /12 / 95.*

Capítulo 26

Cuidados na preparação de meios de cultura e reagentes para análises microbiológicas

26.1. INTRODUÇÃO

A maioria das orientações e informações desse capítulo são da ISO/TS 11133-1 (2009) e do *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001).

As orientações são gerais e devem ser complementadas com as do anexo 1, que apresenta a formulação e as orientações específicas de preparo de cada meio e reagente citado no Manual.

Os ensaios microbiológicos utilizam uma variedade enorme de meios de cultura, cuja formulação varia em função do(s) microrganismo(s) que serão cultivados e dos ensaios a que se destinam. A formulação é o conjunto de ingredientes que, balanceados em proporções adequadas, conferem ao meio de cultura as características que o distinguem. Esses ingredientes podem ser de vários tipos, apresentados a seguir.

26.1.1. INGREDIENTES UTILIZADOS NA FORMULAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Os ingredientes utilizados na formulação de meios de cultura, geralmente disponíveis comercialmente na forma desidratada, incluem fontes de nutrientes, agentes seletivos, agentes diferenciais, agentes redutores, agentes tamponantes, substratos cromogênicos e fluorogênicos e ágar (agente gelificante). Os ingredientes da formulação são dissolvidos em água, cuja qualidade é crítica para o bom desempenho dos meios preparados.

26.1.1.1. Água para o preparo de meios e reagentes

A água usada no preparo de meios e regentes deve ser purificada (destilada, deionizada ou de qualidade equivalente). A estocagem deve ser feita em frascos de material inerte, como vidro neutro ou polietileno. Para avaliação da qualidade, a ISO/TS 11133-1 (2009) estabelece dois parâmetros, a resistividade e a contagem total de aeróbios mesófilos. A resistividade deve ser maior ou igual a 0,4MΩ cm. Na prática esse parâmetro é controlado pela determinação da condutividade (inverso da resistividade), que deve ser menor ou igual a 25µS/cm. A contagem total de aeróbios mesófilos não deve ultrapassar 10^3 UFC/ml, preferencialmente 10^2 UFC/ml.

A ISO/TS 11133-1 (2009) não especifica a freqüência do monitoramento, que segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21º Ed. (EATON *et al.*, 2005, Seção 9020.B.4.d), deve ser contínuo ou a cada uso para a condutividade e mensal para a contagem total de aeróbios mesófilos.

26.1.1.2. Fontes de nutrientes em meios de cultura

Os nutrientes necessários ao crescimento variam com o tipo de microrganismo. Alguns são muito versáteis e exigem poucos constituintes nutritivos (basicamente, uma fonte de carbono

e uma fonte de nitrogênio) e outros são extremamente dependentes (chamados de fastidiosos), exigindo vitaminas, peptídeos ou aminoácidos específicos. As principais fontes de nutrientes usadas na formulação de meios de cultura são as peptonas, os extratos de carne, levedura ou malte, os carboidratos, os minerais e os metais essenciais.

Peptonas. Peptona é o nome genérico dos produtos da hidrólise ácida ou enzimática de proteínas de origem animal (carne, fígado, caseína, gelatina), vegetal (soja) ou microbiana (extrato de levedura). São ingredientes complexos, o que significa que sua exata composição não é conhecida. São fontes de nitrogênio, contendo peptídeos, aminoácidos e vitaminas, cujos tipos e quantidades variam em função da proteína utilizada e da forma como foi feita a hidrólise.

A hidrólise ácida ataca todas as ligações peptídicas das proteínas, liberando os aminoácidos. Alguns aminoácidos são totalmente perdidos, como o triptofano, outros são parcialmente quebrados, como a cistina, a serina e a treonina, e outros são convertidos à sua forma ácida, como a asparagina e a glutamina. As vitaminas podem ser total ou parcialmente destruídas, dependendo do grau de hidrólise.

A hidrólise enzimática é mais branda e ataca apenas as ligações peptdícas específicas da enzima, sendo mais utilizadas: **a) Enzimas do pâncreas** - atacam as ligações peptídicas envolvendo arginina, lisina, tirosina, triptofano, fenilalanina e leucina. Incluem principalmente a tripsina e a quimiotripsina, que quebram as proteínas em peptídeos e, em menor quantidade, a carboxipeptidase A e B, que produzem uma pequena fração de aminoácidos livres. A hidrólise com as enzimas do pâncreas é chamada digestão pancreática e resulta em uma mistura de aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular. A hidrólise com tripsina é chamada digestão tríptica. **b) Pepsina** - enzima de origem animal, ataca as as ligações peptídicas envolvendo fenilalanina ou leucina, liberando predominantemente peptídeos. A hidrólise com pepsina é chamada digestão péptica e resulta em peptídeos de peso molecular relativamente alto. **c) Papaína** - enzima de origem vegetal, ataca as as ligações peptídicas envolvendo arginina, lisina e fenilalanina, liberando predominantemente peptídeos.

As peptonas são comercializadas com várias denominações, dependendo da fonte da proteína, da forma de hidrólise e da marca do fabricante. Essas denominações comerciais foram utilizadas na descrição da formulação original de muitos meios de cultura, mas gradativamente têm sido substituídas pela denominação padrão estabelecida pela ISO 11133-1:2009, apresentada no Quadro 26.1.

Quadro 26.1. Denominação padrão da ISO 11133:2009 para peptonas.

ISO 11133-1:2009	Denominação em português	Produtos
Enzymatic digest of casein	Hidrolizado (enzimático) de caseína	Peptonas de caseína obtidas por digestão enzimática, incluindo tríptica (tryptic digest of casein), péptica (peptic digest of casein) ou pancreática (pancreatic digest of casein, tryptone)
Enzymatic digest of soybean meal	Hidrolizado (enzimático) de soja	Peptonas de soja obtidas por digestão enzimática incluindo hidrólise com enzima de origem animal ou com papaína
Enzymatic digest of animal tissues	Hidrolizado (enzimático) de tecido animal	Peptonas de tecido animal (carne) obtidas por digestão enzimática, incluindo péptica (peptic digest of animal tissues) ou pancreática (pancreatic digest of animal tissues)
Enzymatic digest of animal and plant tissues	Hidrolizado (enzimático) de tecido animal e vegetal	Peptonas mistas de tecido animal e vegetal, obtidas por digestão enzimática, incluindo tríptica (tryptic digest of animal and plant tissues, tryptose)
Enzymatic digest of heart	Hidrolizado (enzimático) de coração	Peptonas de coração obtidas por digestão enzimática
Enzymatic digest of gelatin	Hidrolizado (enzimático) de gelatina	Peptonas de gelatina obtidas por digestão enzimática

Abaixo estão descritos os equivalentes comerciais mais comuns dos diversos tipos de peptonas usadas na formulação de meios de cultura. Os produtos de um mesmo grupo não são, necessariamente, equivalentes na composição final, que depende da matéria prima usada e do grau de hidrólise aplicado.

Peptonas de tecido animal obtidas por digestão enzimática
Peptic Digest of Animal Tissue (Peptone A) (ACUMEDIA 7181)
Peptone (BACTO™ 211677)
Peptone Bacteriological (OXOID L37)
Peptone Bacteriological Neutralized (OXOID L34)
Peptone from meat (pancreatic) (MERCK 1.07214)
Peptone from meat (peptic) (MERCK 1.07224)
Peptona P (peptic) (OXOID L49)
Thiotone™ E Peptone (BBL™ 212302)

Peptonas de caseína obtidas por hidrólise ácida
Acidicase™ Peptone (BBL™ 211843)
Casamino Acids (BACTO™ 223050)
Casamino Acids Technical (BACTO™ 223120)
Casamino Acids Vitamin Assay (DIFCO™ 228830)
Casein hydrolysate (acid) (MERCK 1.02245)
Casein hydrolysate (acid) (OXOID L41)
Casein Acid Hydrolysate (ACUMEDIA 7229)

Peptonas de caseína obtidas por digestão pancreática
Casitone (BACTO™ 225930)
Pancreatic Digest of Casein (Peptone C) (ACUMEDIA 7179)
Trypticase™ Peptone (BBL™ 211921)
Tryptone (BACTO™ 211705)
Tryptone (OXOID L42)
Tryptone (peptone from casein, pancreatic) (MERCK 1.07213)
Tryptone (peptone from casein, pancreatic free from sulfonamides antagonists) (MERCK 1.02239)

Peptonas de gelatina obtidas por digestão pancreática
Gelysate™ Peptone (BBL™ 211870)
Pancreatic Digest of Gelatin (Peptone G) (ACUMEDIA 7182)
Peptone from gelatin (pancreatic) (MERCK 1.07284)

Peptonas de soja obtidas por digestão com papaína
Papaic Digest of Soybean Meal (Peptone S) (ACUMEDIA 7180)
Phytone™ Peptone (BBL™ 211906)
Peptone S Ultrafiltered (ACUMEDIA 7680)
Soya peptone (peptone from soyameal, papainic) (MERCK 1.07212)
Soya Peptone (OXOID L44)

Peptona de soja obtida por digestão com enzima de origem animal
Soytone (BACTO™ 243620)

Peptonas com teor elevado de peptídeos de alto peso molecular (proteoses)
Proteose Peptone (BACTO™ 211684)
Proteose Peptone (OXOID L85)
Proteose Peptone (MERCK 1.07229)

Peptonas mistas com elevada proporção de proteínas digeridas com tripsina
Tryptose™ (BACTO™ 211713)
Tryptose (OXOID L47)
Tryptose (triptic) (MERCK 1.10213)

Peptonas mistas
Dipeptone (ACUMEDIA 7183)
Neopeptone (BACTO™ 211681)
Polypeptone™ (BBL™ 211910)
Special Peptone (OXOID L72)
Universal Peptone M 66 (MERCK 1.07043)

Segundo o Merck Microbiology Manual (2005), dessa lista os seguintes produtos são equivalentes:

- Acidicase™ Peptone (BBL™ 211843) e Casein Hydrolysate (acid) (MERCK 1.02245 e OXOID L41)
- Casamino Acids (BACTO™ 223050) e Casein Hydrolysate (acid) (MERCK 1.02245 e OXOID L41)
- Gelysate™ Peptone (BBL™ 211870) e Peptone from gelatin (pancreatic) (MERCK 1.07284)
- Peptone (BACTO™ 211677), Peptone from meat (peptic) (MERCK 1.07224) e Peptone P (OXOID L49)
- Peptone from meat (pancreatic) (MERCK 1.07214) e Peptone Bacteriological (OXOID L37)
- Phytone™ Peptone (BBL™ 211906), Soya peptone (MERCK 1.07212) e Soya peptone (OXOID L44)
- Thiotone™ E Peptone (BBL™ 212302) e Peptone from meat (peptic) (MERCK 1.07224)
- Trypticase™ Peptone (BBL™ 211921) e Tryptone (peptone from casein, pancreatic) (MERCK 1.07213)
- Tryptone (peptone from casein, pancreatic) (MERCK 1.07213) e Tryptone (OXOID L42)
- Tryptose (triptic) (MERCK 1.10213) e Tryptose (OXOID L47)

Extrato de carne, extrato de levedura e extrato de malte. Assim como as peptonas, os extratos também são ingredientes complexos, cuja exata composição não é conhecida.O extrato de carne é a infusão (caldo) obtido no cozimento da carne, concentrado ou desidratado. Contém frações hidrossolúveis de proteínas (aminoácidos, pequenos peptídeos), vitaminas, minerais, elementos traço e carboidratos (glicogênio). O extrato de levedura é um autolisado das leveduras produzida na fabricação de cerveja ou das leveduras de panificação. É considerado uma fonte rica

em aminoácidos e vitaminas do complexo B, contendo ainda proteínas, carboidratos e micronutrientes. O extrato de malte é preparado através da extração de constituintes solúveis de grãos germinados, evaporados em baixa temperatura até a secagem. Conserva os componentes nitrogenados e os carboidratos.

Carboidratos. Os carboidratos, particularmente a glicose, são a fonte de carbono e energia utilizadas pela maioria dos microrganismos. Alguns grupos ou gêneros de bactérias não crescem na ausência desses componentes e a capacidade de utilizar um determinado tipo de carboidrato é característica de cada espécie microbiana. Essa diferença é explorada nas formulações, para favorecer ou diferenciar microrganismos específicos. Os carboidratos mais usados em meios de cultura são as pentoses (arabinose, xilose), as hexoses (glicose, frutose, galactose, manose), os dissacarídeos (sacarose, lactose, maltose), os polissacarídeos (amido, glicogênio), os glicosídeos (esculina, salicina) e os açúcar-álcoois (sorbitol, dulcitol, manitol, adonitol, glicerol). As características mais verificadas a partir de carboidratos são a produção de ácido e a produção de gás.

Minerais e metais essenciais. Há muitos componentes inorgânicos essenciais ao crescimento microbiano, classificados, como macro componentes (macronutrientes) típicos (Na, K, Cl, P, S, Ca, Mg, Fe) e micro componentes (micronutrientes) típicos (Zn, Mn, Br, B, Cu, Co, Mo, V, Sr). Muitos deles estão presentes nas peptonas e extratos, não sendo necessariamente adicionados na formulação.

26.1.1.3. Agentes seletivos

Agentes seletivos são compostos inibidores do crescimento de microrganismos, adicionados aos meios de cultura para inibir as espécies sensíveis e favorecer (selecionar) as resistentes. Os mais utilizados são os antibióticos, os sais biliares e compostos químicos diversos.

Antibióticos. Os antibióticos mais amplamente utilizados são a polimixina B, a ampicilina, a novobiocina, a D-cicloserina, a oxitetraciclina, a vancomicina, a trimethiprima, a cicloeximida e o moxalactam.

Bile e sais biliares. A bile é um produto do fígado, composto por ácidos graxos, ácidos biliares, sais inorgânicos, sulfatos, pigmentos biliares, colesterol, mucina, lecitina, ácido glicuronico, porfirinas e uréia. No fígado, os ácidos biliares são conjugados com glicina ou taurina, para destoxificação, passando para a forma de sais biliares. Os ácidos e os sais biliares têm ação sobre bactérias Gram positivas e a bile ou esses derivados são usados em meios seletivos, para o isolamento de bactérias Gram negativas. Os produtos mais usados como ingredientes são:

Bile desidratada, Oxbile, Oxgall. A bile desidratada é preparada a partir da bile recém obtida de boi ou carneiro, evaporada e desidratada. O produto preparado a partir de bile de boi é comumente chamado de oxbile ou oxgall.

Sais biliares. Um refinamento no uso da bile é a extração dos sais biliares, separando-os dos demais constituintes da bile. A mistura em pó é composta principalmente de glicolato de sódio e taurocolato de sódio.

Sais biliares Nº 3. São uma fração modificada dos sais biliares, com ação inibitória em concentrações bem menores (menos de um terço da concentração dos sais biliares).

Desoxicolato de sódio. Sal do ácido desoxólico, que é o ácido biliar com maior efeito antibacteriano. É obtido por um processo de separação dos demais sais biliares, sendo utilizado com um sal relativamente puro.

Compostos químicos. Os compostos químicos incluem iodo, tetrationato de sódio, azida de sódio, corantes (verde brilhante, verde de malaquita), metais (selenito de sódio, telurito de potássio) e surfactantes (lauril sulfato de sódio).

26.1.1.4. Agentes diferenciais

Os agentes diferenciais são compostos utilizados para verificar características típicas de espécies de microrganismos, permitindo diferenciá-las de outras espécies. Os mais utilizados são os indicadores de pH, os indicadores de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e outros.

Indicadores de pH. Os indicadores de pH são utilizados para diferenciar os microrganismos que produzem dos que não produzem ácido ou base durante o crescimento. A produção de ácidos é resultante da fermentação de carboidratos e a produção de base (amônia) é resultante da descarboxilação de aminoácidos ou da hidrólise da uréia. Os indicadores de pH mudam de cor em determinadas faixas de pH e os mais utilizados em meios de cultura são os descritos abaixo:

Indicador	pH de viragem
Azul de bromotimol	6,1 = amarelo, 7,7 = azul
Azul de timol	8,0 = amarelo, 9,6 = azul
Púrpura bromocresol	5,4 = amarelo, 7,0 = púrpura (roxo)
Vermelho de cresol	7,4 = amarelo, 9,0 = vermelho
Vermelho de fenol	6,9 = amarelo, 8,5 = vermelho
Vermelho Neutro	6,8 = vermelho, 8,0 = amarelo

Indicadores de sulfeto de hidrogênio (H_2S). Os indicadores de H_2S são compostos de ferro (citrato férrico, citrato férrico amoniacal e sulfato férrico amoniacal), utilizados para diferenciar microrganismos que produzem dos que não produzem H_2S, no metabolismo de aminoácido sulfurados. Quando esses compostos reagem com o H_2S, é produzido sulfeto de ferro, um composto preto e solúvel, que se difunde e provoca o escurecimento do meio de cultura.

Outros agentes diferenciais. Outros agentes diferenciais bastante utilizados são a gema de ovo, para diferenciar os microrganismos que produzem dos que não produzem enzimas lipolíticas, a esculina, para diferenciar os microrganismos que hidrolizam dos que não hidrolizam esse composto e o sangue, para diferenciar os microrganismos que produzem dos que não produzem hemólise.

26.1.1.5. Agentes redutores

Agentes redutores podem ser adicionados aos meios de cultura com duas finalidades. A primeira é produzir um ambiente reduzido (anaeróbio), com potencial de óxido redução (redox) favorável ao crescimento de microrganismos estritamente anaeróbios. Para essa finalidade, a cisteína e o tioglicolato são os agentes redutores mais usados no preparo de meios de cultura. A segunda é indicar visualmente (por mudança de cor) o potencial de óxido redução do meio de cultura. Para essa finalidade os indicadores redox mais utilizados são a resazurina e o azul de metileno.

26.1.1.6. Agentes tamponantes

Os agentes tamponantes são utilizados para manter o pH dos meios de cultura nas faixas ideais de crescimento dos microrganismos a que se destinam. O pH pode sofrer variações significativas após a adição de uma amostra ácida ou básica ou após a produção de ácidos ou bases no crescimento. Os agentes tamponantes mais usados são os fosfatos, os citratos e os acetatos.

26.1.1.7. Substratos cromogênicos e fluorogênicos

São compostos adicionados aos meios de cultura para verificar a produção de enzimas características de certos grupos ou espécies de microrganismos. Quando utilizados como substrato

por essas enzimas, são formados produtos de reação coloridos ou fluorescentes, que permitem detectar a ocorrência da reação. Os mais utilizados são:

X-β-D-Glicuronídeo (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicuronídeo). Também chamado de BCIG, é um substrato cromogênico para a enzima β-glicuronidase, característica de *E. coli.* O produto formado na reação é azul.

MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo). Substrato fluorogênico para a enzima β-glicuronidase, característica de *E. coli.* O produto formado na reação é azul fluorescente sob luz UV (336nm).

ONPG (Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo). Substrato cromogênico para a enzima β-gactosidase, característica dos coliformes totais. O produto formado na reação é amarelo.

Salmon-Gal (6-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo). Substrato cromogênico para a enzima β-galactosidase, característica dos coliformes totais. O produto formado na reação é salmão a vermelho.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo). Substrato cromogênico para a enzima β-galactosidase, característica dos coliformes totais. O produto formado na reação é intensamente azul.

X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicopiranisídeo). Substrato cromogênico para a enzima β-glicosidase, característica de enterococos. O produto formado na reação é intensamente azul.

X-Alfa-Glicosídeo (5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-glucopiranosideo). Substrato cromogênico para a enzima α-glicosidase, característica de *Cronobacter.* O produto formado na reação é verde ou verde azulado.

26.1.1.8. Ágar

O ágar-ágar é o agente gelificante mais usado em meios de cultura, embora alguns meios ainda utilizem a gelatina. É obtido de algas marinhas agarofíticas, principalmente *Gelidium*, *Gracilaria* e *Pterocladia.* É extraído como uma solução aquosa em temperaturas superiores a 100ºC, filtrado, desidratado e moído até a forma de pó. É inerte à ação microbiana, solúvel em água quente mas não em água fria, solidifica entre 32 e 39ºC, funde a mais de 84ºC e forma géis fortes e reversíveis, em concentrações baixas (1,2 a 1,5%). O produto processado para fins microbiológicos tem alta pureza e não é tóxico. É hidrolizado com calor em pH ácido, perdendo a capacidade gelificante se aquecido em meios com pH inferior a 5,0.

26.1.2. CLASSIFICAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

A ISO 11133-1 (2009) classifica os meios de cultura em função da composição, da consistência, da forma de preparação e da função.

26.1.2.1. Classificação pela composição

Meios quimicamente definidos. São meios formulados com ingredientes de composição química definida, cuja estrutura molecular e grau de pureza são conhecidos.

Meios complexos. Chamados de meios quimicamente indefinidos na ISO 11133-1 (2009), são aqueles que contêm em sua formulação ingredientes complexos (peptonas, extratos de carne, extrato de levedura, extrato de malte, bile desidratada, sais biliares, ágar), cuja composição exata não é conhecida.

26.1.2.2. Classificação pela consistência

Meios líquidos. Também chamados de caldos, são meios constituídos de uma solução aquosa dos ingredientes da formulação. Em alguns caldos são adicionadas partículas sólidas, como no PE-2 (contém ervilhas) e no Meio de Carne Cozida (contém partículas de carne). São acondicionados em tubos ou frascos.

Meios sólidos. Também chamados de ágar, porque contém ágar como agente gelificante, em concentração de 1,5% ou em redor. A consistência é firme e não apresenta fluidez. São acondicionados em placas de Petri ou em tubos, estes últimos podendo ou não ser inclinados durante a fase de solidificação, formando uma rampa. Em alguns meios é usada gelatina em lugar do ágar.

Meios semi-sólidos. Contém ágar em concentração de 0,3% ou em redor, com consistência fluída. São acondicionados em tubos, não inclinados.

26.1.2.3. Classificação pela forma de preparação

Meios prontos para uso. São meios de cultura disponíveis comercialmente já preparados, estéreis e distribuídos em placas, tubos ou frascos, não requerendo qualquer manipulação no laboratório.

Meios desidratados. São formulações completas ou semi completas (bases) de meios de cultura, disponíveis comercialmente na forma desidratada. As formulações completas exigem a hidratação, a esterilização e a distribuição em placas, tubos ou frascos no laboratório. As bases exigem ainda a preparação individual de alguns componentes da formulação (suplementos), que são sensíveis ao calor e não fazem parte da formulação comercial. Os suplementos são preparados e esterilizados separadamente, geralmente por filtração, sendo então adicionados às bases estéreis. Vários suplementos encontram-se disponíveis comercialmente na forma desidratada, já estéreis, requerendo apenas a hidratação para adição nos meios de cultura.

Meios formulados. São meios de cultura totalmente preparados no Laboratório, a partir dos ingredientes individuais de sua formulação.

26.1.2.4. Classificação pela função

Meios de transporte. Meios cuja função é manter a viabilidade dos microrganismos durante o intervalo de tempo entre a coleta e a análise da amostra. Geralmente contém componentes que impedem a multiplicação dos microrganismos mas garantem a sua preservação.

Meios de manutenção. Meios para manutenção de culturas em estoque por longos períodos de tempo, preservando a viabilidade.

Meios de ressuscitação. Meios para reparação de células injuriadas, permitindo a recuperação de sua capacidade normal de crescimento, sem necessariamente promover a multiplicação.

Meios de enriquecimento. Meios predominantemente líquidos, com composição particularmente favorável à multiplicação dos microrganismos a que se destinam. Podem ser não seletivos, seletivos ou seletivos diferenciais.

> **Meios de enriquecimento não seletivo**. Destinam-se ao enriquecimento de microrganismos em geral, favorecendo a multiplicação da maioria. Nos ensaios com duas fases de enriquecimento, o meio usado na primeira fase geralmente é chamado de meio de pré enriquecimento.
>
> **Meios de enriquecimento seletivo**. Destinam-se ao enriquecimento de microrganismos específicos, contendo agentes seletivos para inibir a maioria dos outros.

Meios de enriquecimento seletivo diferencial. Destinam-se ao enriquecimento e diferenciação de microrganismos específicos. Contém agentes seletivos, para inibir a maioria da microbiota acompanhante, e agentes diferenciais, para verificar uma ou mais características típicas do microrganismo alvo.

Meios de isolamento/plaqueamento. Podem ser meios sólidos em placas, que objetivam favorecer a multiplicação dos microrganismos e isolar uns dos outros, através da formação de colônias separadas. Nessa forma são comumente chamados de meios de plaqueamento e usados na contagem padrão em placas ou na inoculação por estrias de esgotamento. Também podem ser meios sólidos ou semi sólidos em tubos, para onde são normalmente transferidas (repicadas) as culturas (puras) obtidas em colônias isoladas. Assim como os meios de enriquecimento, os meios de isolamento podem ser não seletivos, seletivos ou seletivos diferenciais.

Meios de isolamento/plaqueamento não seletivo. Destinam-se ao isolamento e/ou contagem de microrganismos em geral, favorecendo a multiplicação da maioria.

Meios de isolamento/plaqueamento seletivo. Destinam-se ao isolamento e/ou contagem de microrganismos específicos, contendo agentes seletivos para inibir a maioria dos outros.

Meios de isolamento/plaqueamento seletivo diferencial. Destinam-se ao isolamento e/ou contagem de microrganismos específicos, contendo agentes seletivo, para inibir a maioria dos outros, e agentes diferenciais, para verificar características típicas que diferenciem o alvo dos outros.

Meios de identificação. São meios para inoculação de culturas puras e verificação de características típicas para identificação. Alguns são usados também como meio de isolamento, no repique direto de colônias isoladas em meios de plaqueamento.

26.2. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Os procedimentos apresentados abaixo são gerais e aplicam-se a uma grande parte dos meios utilizados na análise de alimentos. Há, entretanto, vários outros que seguem procedimentos diferenciados, descritos no anexo 1. Antes de preparar qualquer meio de cultura pela primeira vez, consultar o anexo 1, para familiarizar-se com essas variações.

Sempre que disponíveis, meios desidratados são mais recomendados do que meios formulados no laboratório. Qualquer exceção a essa regra é citada nos capítulos específicos dos ensaios em que o meio seja utilizado.

Os meios desidratados devem ser preparados e estocados de acordo com a orientação do fabricante, mesmo quando diferentes das recomendações apresentadas neste Capítulo. Qualquer exceção a essa regra é citada no anexo 1 ou nos capítulos específicos dos ensaios em que o meio seja utilizado.

26.2.1. ARMAZENAMENTO DOS INSUMOS PARA PREPARO DE MEIOS DE CULTURA

Até o momento do uso, todos os insumos adquiridos para o preparo de meios de cultura devem ser estocados sob condições que garantam sua integridade. A maioria dos produtos traz no rótulo orientações sobre a forma de estocagem, bem como a data de validade. Essas orientações devem ser seguidas, sempre que disponíveis. Além disso, alguns outros cuidados devem ser observados:

As embalagens não devem ser abertas até o momento do uso, mantendo-se os selos e lacres originais, enquanto permanecerem no estoque.

Ao colocar em uso, sempre retirar do estoque o frasco mais antigo primeiro e verificar a validade e as características do material. Frascos vencidos e/ou com absorção de umidade (endurecimento e perda da fluidez do pó) e/ou alteração de cor devem ser descartados.

Registrar a data em que o frasco foi aberto e colocado em uso.

Depois de abertos, estocar os frascos em local seco, protegidos da umidade, mantendo as tampas sempre bem fechadas. Material altamente higroscópico, com advertência em rótulo, deve ser mantido em dessecador.

Corantes e meios que contenham corantes devem ser protegidos da luz. De maneira geral, as embalagens originais são adequadas para esse fim.

Nunca transferir meios e reagentes para embalagens diferentes da original.

26.2.2. PESAGEM E REHIDRATAÇÃO

Nessa etapa é recomendável o uso de máscaras, para evitar a inalação dos pós, geralmente muito finos. Vários meios de cultura contém substâncias tóxicas.

Em um frasco de material inerte de tamanho adequado, colocar parte da água necessária para a rehidratação do material. Usar água de qualidade adequada para o preparo de meios de cultura, conforme especificação do item 26.1.1.1.

Pesar cuidadosamente a quantidade adequada do meio desidratado ou dos ingredientes individuais, transferindo cada componente para o frasco de água. Agitar com uma bagueta, desfazendo qualquer grumo que venha a se formar. Adicionar o restante da água necessária para completar o volume final, agitando novamente.

26.2.3. DISSOLUÇÃO E DISPERSÃO

Se o meio não contiver ágar, agitar o material até a completa dissolução, aquecendo, se necessário. Se o meio contiver ágar, deixar de molho por alguns minutos e então aquecer em banho fervente, agitando freqüentemente até a fusão do ágar. O aquecimento também pode ser feito em chapa aquecida, magnética ou não, ou em chama de bico de Bunsen, usando uma chapa entre a chama e o frasco. Nesses casos, deve-se tomar cuidado para não queimar o material no fundo do frasco, agitando constantemente.

Alguns meios sólidos não podem ser esterilizados em autoclave, sendo apenas fervidos nessa etapa de dissolução e dispersão. Se for necessária a distribuição em placas, fazer a verificação e o ajuste do pH logo depois da fervura (seguir a orientação do item 26.2.8) e distribuir imediatamente nas placas. Não permitir que esses meios solidifiquem antes do plaqueamento, porque não podem ser reaquecidos.

26.2.4. VERIFICAÇÃO E AJUSTE DO pH ANTES DA ESTERILIZAÇÃO

Segundo a ISO 11133-1 (2009), os meios desidratados podem sofrer variação de pH depois da esterilização, sendo necessária uma verificação posterior (item 26.2.8.abaixo). Desde que preparados com água de boa qualidade, a verificação e o ajuste antes da esterilização não é necessária.

Para meios formulados no laboratório, a ISO 11133-1 recomenda verificar e ajustar antes e depois. Utilizar um pHmetro acertado previamente com soluções tampão à temperatura ambiente. No momento da leitura, o meio deve estar à mesma temperatura das soluções tampão, porque valores errôneas podem ser obtidas se esse cuidado não for observado. Os pHmetros são

designados para determinar diferenças de pH entre duas soluções à mesma temperatura. O sistema de ajuste do aparelho, para leitura em diferentes temperaturas, não permite corrigir diferenças de temperatura entre os tampões e o meio de cultura. Para ajustar o pH do meio, adicionar uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) ou de ácido clorídrico (HCl), preparadas em concentração adequada. Essa concentração deve ser tal que o volume de NaOH ou HCl adicionado não seja superior a 10% do volume de meio de cultura.

26.2.5. DISTRIBUIÇÃO

Distribuir o meio em tubos ou frascos apropriados ao uso nos ensaios, com capacidade uma, duas ou três vezes à do volume de meio (ISO/TS 11133-1, 2009). Como orientação, garantir que o ponto central no interior do volume de meio não fique a mais de 2,5cm da superfície do líquido ou das paredes do frasco. Isso assegura um rápido equilíbrio da temperatura, quando o meio é colocado em banho maria (DOWNES & ITO, 2001).

Os meios utilizados em placas não são distribuídos nas placas nessa etapa, mas sim, depois da esterilização. Nesse caso, acondicionar em frascos que permitam a posterior transferência do fluído fundido para as placas.

Os meios utilizados em tubos são distribuídos nos tubos nessa etapa, antes da esterilização. Os meios sólidos devem ser fundidos e bem homogeneizados antes da distribuição, para que todas as alíquotas transferidas para os tubos contenham a mesma quantidade de ágar. Se a homogeneização não for cuidadosa, o meio pode não solidificar em alguns tubos.

Nos tubos de meios líquidos em que é recomendado o uso de tubos de Durham para a coleta de gases, o Durham deve ser colocado nessa etapa, antes da esterilização. Colocar os Durham nos tubos vazios e depois distribuir o meio de cultura. Não é necessario que os Durham sejam preenchidos pelo líquido na distribuição, isso vai ocorrer naturalmente durante a esterilização.

Nos tubos de meios sólidos que são inclinados, a inclinação não é feita nessa etapa, mas sim, depois da esterilização, durante a solidificação.

26.2.6. ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR ÚMIDO

A maioria dos meios de cultura são esterilizados pelo calor úmido, porém, há meios sensíveis ao calor que são esterilizados por filtração ou simplesmente fervidos. A forma de esterilização recomendada para cada meio citado no manual é especificada no anexo 1.

Preparação do material para esterilização. O *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001) recomenda: a) Esterilizar o material no máximo uma hora depois da preparação. b) Fundir os meios contendo ágar antes da esterilização (item 26.2.3). c) Cobrir as tampas dos frascos com papel alumínio ou papal kraft amarrado, para proteção contra recontaminação e evaporação durante a estocagem posterior. d) Afrouxar as tampas dos frascos e tubos com tampa de rosca, para permitir a entrada do vapor.

Carregamento da autoclave. O *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001) recomenda: a) Não encher demasiadamente a autoclave, para não interferir na exaustão de ar e entrada de vapor. b) Manter entre os frascos uma distância mínima de meia polegada (1,27cm), em todas as direções. c) Não esterilizar frascos com volume de meio maior do que 3 a 4% da capacidade da autoclave.

Ciclo de esterilização. A esterilização pelo calor úmido deve ser feita em autoclaves a vapor saturado, operando com o binômio temperatura/tempo de 121°C/15min. A temperatura deve subir lentamente, até atingir 121ºC, mas o tempo de subida não deve ultrapassar dez minutos, a

partir do início da exaustão de ar. Terminada a esterilização, a pressão deve ser reduzida gradualmente (em não menos do que 15min) porque os líquidos estão a uma temperatura acima do seu ponto de ebulição, podendo ferver e vazar.

Há meios de cultura que são esterilizados sob outras condições, especificadas no anexo 1, principalmente aqueles que contém carboidratos sensíveis, esterilizados a 116 ou 118ºC. Para frascos com volume maior do que um litro, a ISO/TS 11133-1 (2009) recomenda que o ciclo de esterilização seja adaptado, se necessário, seguindo a instrução do fabricante do equipamento.

Monitoramento do processo de esterilização. A ISO/TS 11133-1 recomenda que o desempenho da autoclave seja monitorado para controle da esterilização. Para isso, a Resolução SS 374 da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, de 15/12/1995, recomenda o uso de indicadores químicos e biológicos.

> **Indicadores químicos** comprovam a exposição do material ao calor, embora não garantam que o mesmo esteja esterilizado. Devem ser utilizados em cada batelada, na forma de fitas ou selos adesivos, observando-se, a cada uso, se a fita ou selo indica a aplicação do calor. Equivalentes comerciais: Fita de Autoclave 3M 1222 (cor creme claro com listras intermitentes diagonais brancas, impregnadas de substância química indicadoras de processo que, após o ciclo, mudam para cor cinza a grafite).
>
> **Indicadores biológicos** avaliam a eficácia da esterilização e devem ser aplicados pelo menos uma vez por semana, no primeiro ciclo de esterilização. Podem ser utilizadas fitas de papel impregnadas com esporos viáveis de *Geobacillus sthearothermophilus* ATCC 7953, na quantidade de $5x10^5$ a $5x10^6$ esporos por fita, ou ampolas com a suspensão de esporos. *O Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001) recomenda colocar uma ou mais fitas ou ampolas no centro da carga, preferencialmente dentro de um frasco similar aos que estiverem sendo processados. Após a esterilização, incubar as fitas ou ampolas a 55ºC por 48 horas, não devendo ser observado crescimento. Equivalentes comerciais: 3M Attest™ 1262, Merck Sterikon Plus Bioindicator 1.10274.

Os indicadores químicos e biológicos não detectam superaquecimento, que pode ocorrer principalmente quando frascos de volume maior que um litro são submetidos à esterilização. As principais indicações de superaquecimento são: perda do poder gelificante do ágar, alteração significativa do pH do meio, alteração da cor do meio, escurecimento de meios contendo açúcar (reação de Maillard), formação de precipitados, perda do poder seletivo e perda de produtividade (crescimento pobre). A ISO/TS 11133-1 recomenda que a temperatura do processo de esterilização seja monitorada com termopares, para assegurar-se de que o valor especificado foi atingido e não ultrapassado.

26.2.7. ESTERILIZAÇÃO POR FILTRAÇÃO

A esterilização por filtração é utilizada para alguns poucos meios de cultura sensíveis ao calor e, mais freqüentemente, para a esterilização de suplementos, que serão adicionados à bases de meios de cultura, previamente esterilizadas por calor úmido. Consiste na passagem do material por um filtro membrana estéril, com poro de 0,2 ou 0,45µm, que retém os microrganismos. Só é aplicável a líquidos límpidos e sem sólidos em suspensão. As membranas podem ser feitas de éster de celulose, nylon ou politetrafluoroetileno. São comercializadas já estéreis ou não, no segundo caso devendo ser esterilizadas em autoclave (121ºC/15min).

A esterilização por filtração pode ser feita de duas formas: filtração à vácuo, utilizando um conjunto de filtração, ou filtração sob pressão, utilizando seringas.

Esterilização por filtração à vácuo em conjuntos de filtração. O conjunto de filtração é composto de um porta filtro, um tubo acomodado no interior de um kitasato e um copo de filtração. O porta filtro é um tipo de funil cuja parte superior é plana, para acomodar o filtro membrana e, sobre essa, o copo de filtração, preso por uma presilha. A parte inferior do porta filtro é acoplada ao tubo, no interior do kitasato que, conectado à uma bomba de vácuo, força a passagem do líquido pela membrana, sendo recolhido no tubo. Antes do início da filtração, o porta filtro deve ser acoplado ao tubo no kitasato, embrulhado em papel kraft e esterilizado em autoclave (121ºC/30min). Na saída do kitasato para a bomba de vácuo deve ser colocado um tampão de algodão. Os copos de filtração devem ser embrulhados separadamente em papel kraft e também esterilizados em autoclave (121ºC/30min). Alternativamente podem ser utilizados copos descartáveis estéreis.

No momento do uso, desembrulhar as duas partes em uma câmara de fluxo laminar. Preparar o conjunto ajustando a membrana no porta filtro (com a face quadriculada para cima) e o copo de filtração sobre a membrana. Conectar o kitasato à bomba de vácuo, para proceder à filtração. Após a passagem do líquido, retirar o copo, desconectar o porta filtro e, com uma pinça flambada, retirar o tubo e fechar imediatamente.

Esterilização por filtração sob pressão usando seringas. As seringas permitem a filtração de menores volumes. As membranas são adquiridas já esterilizadas, em um aparato de filtração também estéril, que pode ser acoplado às seringas de vidro ou plástico, como as vendidas em farmácias. No momento do uso, coletar o líquido na seringa, puxando o embolo para fora. Em uma capela de fluxo laminar, abrir o aparato de filtração, acoplar à seringa e forçar o embolo para baixo, recolhendo o líquido filtrado em um tubo estéril.

26.2.8. VERIFICAÇÃO DEPOIS DA ESTERILIZAÇÃO

Depois da esterilização, todos os meios devem ser verificados quanto à cor, consistência, pH e esterilidade. A ISO 11133-1 não traz o procedimento para verificar esses parâmetros, mas a verificação da cor e da consistência é visual.

Verificação do pH. Para a verificação do pH, o *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001) recomenda que seja utilizado um pHmetro, ajustado previamente, com soluções tampão à temperatura ambiente. No momento da leitura, o meio deve estar à mesma temperatura das soluções tampão, porque valores errôneas podem ser obtidas se esse cuidado não for observado. Os pHmetros são designados para determinar diferenças de pH entre duas soluções à mesma temperatura. O sistema de ajuste do aparelho, para leitura em diferentes temperaturas, não permite corrigir diferenças de temperatura entre os tampões e o meio de cultura.

Para meios líquidos, retirar asséspticamente uma alíquota de volume conhecido, resfriar à temperatura ambiente e verificar o pH. O valor deve ser o especificado para o meio $\pm$ 0,2 unidades de pH, a menos que outra orientação seja apresentada no anexo 1.

Para meios contendo ágar, retirar uma alíquota asséspticamente, resfriar à temperatura ambiente, macerar o material sólido e verificar o pH.

No caso de meios que não podem ser esterilizados em autoclave, sendo apenas fervidos, a verificação do pH deve ser feita logo depois da fervura (resfriando antes).

Verificação da esterilidade. Para a verificação da esterilidade, o *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001) recomenda duas alternativas. Uma é incubar, antes do uso, uma amostra representativa de cada batelada de material esterilizado, na

mesma condição em que os meios serão utilizados nos ensaios. Outra é incubar, junto com os meios inoculados nos ensaios, amostras não inoculadas dos meios da mesma batelada.

26.2.9. PREPARAÇÃO DOS SUPLEMENTOS PARA MEIOS DE CULTURA

A preparação de suplementos varia caso a caso, devendo ser seguidas as orientações do anexo 1. O principal cuidado deve ser a manipulação de produtos em pó contendo agentes tóxicos, particularmente antibióticos. Utilizar máscaras e evitar a dispersão dos pós, que podem provocar reações alérgicas.

26.2.10. ESTOCAGEM DOS MEIOS ESTERILIZADOS ATÉ O MOMENTO DO USO

Estocar os meios de cultura estéreis em local limpo, livre de poeira, não exposto à luz solar direta e descontaminado periodicamente, para prevenir a perda de esterilidade. Como regras gerais de armazenamento, a ISO 11133-1 (2009) recomenda:

Registrar sempre a data da preparação e a data de validade.

No caso de meios basais (em frascos ou tubos), antes da adição dos suplementos, estocar por três a seis meses, se necessário sob refrigeração (5±3ºC). Depois da adição dos suplementos, usar no mesmo dia (exceto se houver outra recomendação no capítulo especifico) e não fundir novamente.

Meios completos que não contém ingredientes sensíveis ao calor, embora não citados pela ISO 11133-1, geralmente são estocados como os meios basais, enquanto não distribuídos em placas.

No caso de meios distribuídos em placas, estocar por duas a quatro semanas, se necessário sob refrigeração (5±3ºC). A quantidade de meio deve ser maior do que os 15ml normalmente adicionada às placas de 90mm que serão utilizadas no mesmo dia. Os meios contendo corantes ou outros ingredientes sensíveis devem ser protegidos da luz. É recomendável que as placas sejam envolvidas por filme ou bolsas plásticas, prevenindo a desidratação e a contaminação acidental. Para evitar condensação, as placas devem ser resfriadas antes de embrulhar com filme plástico.

Em qualquer caso, se for verificada perda de umidade, mudança de cor, crescimento microbiano ou qualquer outra alteração, descartar.

26.2.11. PREPARAÇÃO DOS MEIOS NO MOMENTO DO USO

A preparação dos meios de cultura no momento do uso varia caso a caso, podendo envolver as seguintes etapas: fusão do ágar em meios sólidos, adição de suplementos a meios basais, distribuição de meios de plaqueamento em placas, secagem de meios em placas para inoculação em superfície e desaeração de meios para microrganismos anaeróbios.

Fusão do ágar em meios sólidos. A ISO 11133-1 (2009) recomenda que a fusão seja feita em banho maria, sob fervura, ou por outro processo que dê o mesmo resultado. O tempo de aquecimento deve ser o mínimo necessário para a fusão, para evitar super aquecimento. Retirar do banho imediatamente após a fusão, resfriar a 47 ± 2ºC e manter a essa temperatura até o momento do uso, em banho ou estufa com temperatura controlada. Usar em quatro horas, no máximo. O *Compendium* recomenda manter entre 44 e 46ºC, usar em três horas, descartar se for observada formação de precipitado e não fundir novamente o material não utilizado dentro de três horas.

Adição de suplementos a meios basais. A ISO 11133-1 (2009) recomenda que os suplementos sejam adicionados ao meio resfriado a 47 ± 2ºC. Se retirados do refrigerador, aguardar que atinjam

a temperatura ambiente antes de adicionar a meios sólidos, para que não ocorra solidificação do ágar. Misturar delicadamente e distribuir em placas imediatamente, porque esse tipo de meio não pode ser reaquecido.

Distribuição de meios sólidos em placas. A ISO 11133-1 (2009) recomenda que seja adicionada às placas uma quantidade de meio suficiente para formar uma camada de 2mm. Para placas de 90mm de diâmetro, normalmente são requeridos 15ml de meio. No caso de placas que serão estocadas, incubadas por mais de 48h ou incubadas em temperatura acima de 40ºC, é necessária uma quantidade maior de meio. Colocar as placas em uma superfície plana e fria, para solidificação.

Secagem de meios em placas para inoculação em superfície. Pode ser feita de três formas: a) em capela de fluxo laminar, mantendo as tampas parcialmente abertas por meia a uma hora, b) em estufa a 50°C, mantendo as placas viradas para baixo, sem as tampas, por duas horas (descontaminar a superfície de contato antes de colocar as placas) ou c) em estufa a 25-30°C por 18 a 24 horas.

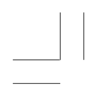
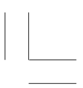
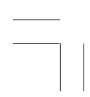
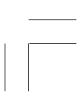
Desaeração de meios para microrganismos anaeróbios. A ISO 11133-1 (2009) recomenda afrouxar as tampas dos tubos ou frascos e ferver em banho por 15 minutos. Apertar as tampas e resfriar imediatamente em banho de gelo.

26.3. REFERÊNCIAS

EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W. & GREENBERG, A.E. (Eds). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed*. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2005.

ISO/TS 11133-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – *Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory, 2nd Ed*., 2009. The International Organization for Standardization.

Resolução SS 374 de 15/12/95. *Altera a Norma Técnica sobre a organização do Centro de Material e Noções de Esterilização.* D.O.E.; Seção I; São Paulo – 16 /12 / 95.

Anexo 1

Preparo dos meios e reagentes para as análises

ÁGAR (CALDO) ACETAMIDA

Aplicação. Meio para *Pseudomonas aeruginosa*, teste confirmativo no método dos tubos múltiplos para análise de água.

Composição

Acetamida	10g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Fosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4)	1,39g
Fosfato monopotássico anidro (KH_2PO_4)	0,73g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)	0,5g
Vermelho de fenol (6ml da solução 0,2%)	0,012g
Ágar (opcional)	15g
Água destilada	1 litro
pH 6,9-7,2 - 121ºC/15min	

Preparação: Dissolver os ingrediente com aquecimento, até a completa fusão do ágar. Distribuir em tubos de 16x150mm (10ml/tubo) e esterilizar em autoclave (121ºC/15min). Inclinar com rampa longa até a solidificação do ágar e estocar à temperatura ambiente por no máximo uma semana. Para preparação do caldo, omitir as 15g de ágar. **Solução 0,2% de vermelho de fenol**: dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais
Acetamide Agar Slants (BBL 221828) (meio sólido pronto distribuído em tubos)

ÁGAR (CALDO) ALI

Aplicação. Meio para isolamento ou contagem de *Alicyclobacillus.*

Composição do caldo

Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$)	0,25g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$	0,5g
Sulfato de amônia $(NH_4)_2SO_4$	0,2g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	3g
Extrato de levedura	2g
Glicose	1g
Amido solúvel	2g
Água destilada	1 litro
pH 3,5 (ajustado com H_2SO_4 1N) - 121ºC/15min	

Preparação. Para a preparação do caldo, dissolver os ingredientes, ajustar o pH em 3,5 e esterilizar a 121ºC/15min. Para a preparação do ágar, dissolver os ingredientes do caldo em concentração dupla (reduzir a quantidade de água destilada à metade), ajustar o pH em 3,5 e esterilizar. Separadamente, preparar o ágar a 3,5% e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar o caldo e o ágar, juntar na proporção 1:1 e plaquear imediatamente.

Equivalentes comerciais

Não disponível

APT
ÁGAR (CALDO) ALL PURPOSE TWEEN

Aplicação. Meio para isolamento de bactérias láticas.

Composição do caldo

Peptona de caseína digestão pancreática	12,5g
Extrato de levedura	7,5g
Dextrose	10g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	5g
Cloreto de sódio	5g
Citrato de sódio	5.0g
Carbonato de sódio	1,25g
Tiamina	0,001g
Tween 80	0,2g
Sulfato de magnésio	0,8g
Cloreto de manganês	0,14g
Sulfato ferroso	0,04g
Água destilada	1 litro
pH 6,7±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar a cada litro de caldo.

Equivalentes comerciais

APT Agar (ACUMEDIA 7302)
APT Agar (DIFCO 265430)

APT Agar (MERCK 1.10453)
APT Broth (DIFCO 265510)

Modificações

Ágar APT acidificado. Preparar o meio adicionando ácido tartárico (solução aquosa a 10%, esterilizada a 121°C/15min) ao Ágar APT estéril, fundido e resfriado, até que o pH chegue a 4,0±0,1.
Ágar APT BCP 2% Sacarose. Preparar o meio adicionando 20g de sacarose e 0,032g de púrpura de bromocresol (BCP) a um litro de APT, antes da esterilização.
Ágar APT 1,5% Glicose. Preparar o meio adicionando 5g de glicose a um litro de APT, antes da esterilização.

AIA
ÁGAR ARGININA FERRO

Aplicação. Meio para provas bioquímicas, teste de arginina dehidrolase e teste de produção de H_2S. Usado na análise de vibrios patogênicos.

Composição

Peptona	5g
Triptona	10g
Extrato de levedura	3g
Cloreto de sódio (NaCl)	20g
Glicose	1g
Cloridrato de L-Arginina	5g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Tiossulfato de sódio	0,3g
Púrpura de bromocresol (2ml de solução 1%)	0,02g
Agar	15g
Água destilada	1 litro
pH 6,8-7,2 - 121°C/10-12min	

Preparação. Dissolver os ingredientes , fundir o ágar, distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/10-12min. Inclinar, mantendo fundo de 2,5cm, no mínimo, porque a reação de descarboxilação da lisina é mais eficiente em condições anaeróbias. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 1g em 1,9ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais
Não disponível

Modificações

Ágar Arginina Ferro (AIA) com 3% de NaCl. O meio contém 2% de NaCl (20g/l). Para preparar com 3% de NaCl, aumentar o teor de sal para 30g/l. Usado na análise de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus.*

ÁGAR AZUL DE TOLUIDINA DNA

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de DNase termoestável (termonuclease) para confirmação de *S. aureus*.

Composição

Cloreto de sódio (NaCl)	10g
TRIS (hidroximetilaminometano)	6,1g
DNA	0,3g
Azul de o-toluidina (8,3ml da solução aquosa 1%)	0,083g
Cloreto de cálcio anidro (5,5ml da solução aquosa 0,1%)	0,0055g
Ágar	10g
Água destilada	1 litro
pH 9,0±0,2	

Preparação do meio. Dissolver 6,1g do Tris em um litro de água destilada e ajustar o pH em 9,0. Adicionar os demais ingredientes, exceto o azul de o-toluidina, aos 1000ml de Tris, dissolver e aquecer até a completa fusão do ágar. Preparar uma solução aquosa 1% do azul de o-toluidina e adicionar 8,3ml a cada litro de meio previamente fundido e resfriado a 45-50ºC, misturando bem. Distribuir em frascos com 50-100 ml e estocar à temperatura ambiente por até quatro meses, com as tampas bem rosqueada, para evitar a evaporação. Não é necessário esterilizar e pode ser utilizado mesmo após várias etapas de fusão.

Preparação das lâminas ou placas para o teste de DNAse. Fundir o meio e verter 3ml sobre uma lâmina de vidro limpa e seca, distribuindo bem para recobrir toda a superfície. Aguardar a solidificação e, com o auxílio de pipetas de Pasteur ou tubos capilares, fazer até 12 cavidades de aproximadamente 2mm de diâmetro no meio, removendo o ágar das cavidades por aspiração. Alternativamente, o meio pode ser distribuído e perfurado em placas de Petri (10ml de meio para cada placa de 15x100mm).

Equivalentes comerciais

Não disponível

BAT
AGAR (CALDO) *BACILLUS ACIDOTERRESTRIS*

Aplicação. Meio para detecção e contagem da *Alicyclobacillus*, método IFU 12/07.

Composição do caldo

Extrato de levedura	2g
Glicose	5g
Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$)	0,25g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$)	0,50
Sulfato de amônia $(NH_4)_2SO_4$	0,20
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	3g
Solução mineral traço*	1ml
Água destilada	1000ml
pH 4,0±0,2 - 121ºC/15min	

* Solução mineral traço

$CaCl_2.2H_2O$	0,66g	$CuSO_4.5H_2O$	0,16g	$CoCl_2.6H_2O$	0,18g	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,30g
$ZnSO_4.7H_2O$	0,18g	$MnSO_4.H_2O$	0,15g	H_3BO_3	0,10g	Água destilada	1000ml
121ºC/15min (estocar em refrigerador)							

Preparação do caldo. Misturar os ingredientes, ajustar o pH com H_2SO_4 1N e esterilizar a 121ºC/15min.

Preparação do ágar. Fundir 15 a 20g de ágar em 500ml de água e esterilizar a 121ºC/15min. Preparar 500ml do caldo em concentração dupla e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar a 50ºC, juntar os 500ml de caldo com os 500ml de ágar e plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido.

Equivalentes comerciais

BAT Agar (Merck 1.07994)

BP
ÁGAR BAIRD-PARKER

Aplicação. Meio seletivo/diferencial para isolamento e contagem de *S.aureus*.

Composição da base

Triptona (peptona de caseína digestão pancreática)	10g
Extrato de carne	5g
Extrato de levedura	1g
Piruvato de sódio	10g
Glicina	12g
Cloreto de lítio	5g
Ágar	20g
Água destilada	940ml
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Suplementos

Solução aquosa de telurito de potássio 1%	10ml/940ml base
Emulsão gema de ovo:salina (1:1 peso/peso)	50ml/940ml base

Preparação. Preparar a base, esterilizar a 121ºC/15min, resfriar a 45-50ºC e adicionar assepticamente os suplementos estéreis previamente preparados. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido. Estocar as placas sob refrigeração por não mais de 48h. **Solução aquosa de telurito de potássio 1%.** Dissolver 1g de telurito de potássio em 100ml de água destilada, esterilizar por filtração e estocar em frasco escuro, sob refrigeração. **Emulsão de gema de ovo.** Mergulhar os ovos em etanol 70% por 10 minutos, flambar, abrir assepticamente e tranferir as gemas para um frasco estéril tarado. Adicionar às gemas uma quantidade de solução salina 0,85% estéril, suficiente para diluição 1:1 (peso/peso). Misturar o conteúdo por agitação ou com o auxílio de baguetas estéreis, até obter uma suspensão homogênea.

Equivalentes comerciais da base

Baird-Parker Agar (ACUMEDIA 7112)
Baird-Parker Agar Base (DIFCO 276840)

Baird-Parker Agar (MERCK 1.05406)
Baird-Parker Medium (OXOID CM 275)

Equivalentes comerciais dos suplementos

Egg Yolk Emulsion (MERCK 1.03784)
Egg Yolk Emulsion (OXOID SR 47)
Egg Yolk Enrichment 50% (DIFCO 233472)
Egg Yolk s/Telurito (LABORCLIN 520088)
Egg Yolk Tellurite Emulsion (MERCK 1.03785)
Egg Yolk Tellurite Emulsion (OXOID SR 54)
EY Tellurite Enrichment (DIFCO 277910)
Tellurite Solution 1% (BBL 211917)

Equivalentes comerciais do meio completo (placas prontas)

Baird-Parker Agar (LABORCLIN 912011)

PDA ACIDIFICADO
ÁGAR BATATA DEXTROSE ACIDIFICADO

Aplicação. Meio seletivo para isolamento de bolores e leveduras.

Composição

Amido de batata ou infusão de 200g de batatas	4g
Dextrose	20g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
121ºC/15min	

Preparação. Preparar o meio e esterilizar a 121ºC/15min. No momento do uso, fundir o ágar, resfriar a 45-50ºC e adicionar uma quantidade suficiente de solução aquosa de ácido tartárico 10% estéril, para obter pH final de 3,5. Geralmente, a adição de 1ml de solução de ácido tartárico para cada 100ml de meio é suficiente para a obtenção do pH requerido, porém, recomenda-se que seja verificada, a cada novo frasco de meio colocado em uso, a quantidade exata de ácido consumida na redução do pH. O meio acidificado deve ser utilizado imediatamente, não podendo ser reaquecido. **Solução de ácido tartárico 10%.** Dissolver 10g do ácido em água destilada e completar o volume para 100ml. Esterilizar por filtração.

Equivalentes comerciais

Potato Dextrose Agar (ACUMEDIA 7149)
Potato Dextrose Agar (DIFCO 213400)
Potato Dextrose Agar (MERCK 1.10130)
Potato Dextrose Agar (OXOID CM 139)
Potato Dextrose Broth (DIFCO 254920)

PDA-ANTIBIÓTICOS
ÁGAR BATATA DEXTROSE COM ANTIBIÓTICOS

Aplicação. Meio seletivo para isolamento de bolores e leveduras.

Composição da base	Concentração normal	Concentração 1,5	Concentração dupla
Amido de batata ou infusão de 200g de batatas	4g	4g	4g
Dextrose	20g	20g	20g
Ágar	15g	15g	15g
Água destilada	1 litro	750ml	500ml
121ºC/15min			

Suplemento

Solução 5mg/ml de antibióticos (clorotetraciclina + cloranfenicol)	2ml/100ml base (final 100mg/l)	3ml/100ml base (final 150mg/l)	4ml/100ml base (final 200mg/l)

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min. No momento do uso, fundir o ágar, resfriar a 45-50ºC e adicionar a solução de antibióticos previamente preparada. O meio completo deve ser utilizado imediatamente, não podendo ser reaquecido. **Solução de antibióticos 5mg/ml.** Dissolver assepticamente 500mg de clorotetraciclina-HCl e 500mg de cloranfenicol em 100ml de tampão fosfato pH 7,2 estéril, estocando em frasco escuro, sob refrigeração. Uma parte do material sólido permanece em suspensão, devendo ser agitado no momento do uso. **Cuidado**. O cloranfenicol é tóxico e o contato com a pele deve ser evitado.

Equivalentes comerciais da base

Potato Dextrose Agar (ACUMEDIA 7149)
Potato Dextrose Agar (DIFCO 213400)
Potato Dextrose Agar (MERCK 1.10130)
Potato Dextrose Agar (OXOID CM 139)
Potato Dextrose Broth (DIFCO 254920)

ÁGAR BILE ESCULINA

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de crescimento na presença de bile e teste de hidrólise da esculina.

Composição	Acumedia 7249	BBL 299068	Oxoid CM 888
Extrato de carne	11g	3g	-
Peptona de gelatina (digestão enzimática)	34,5g	5g	-
Peptona	-	-	8,0
Sais biliares	-	-	20,0
Bile de boi (oxbile ou oxgall)	2,0	20g	-
Esculina	1g	1g	1,0
Citrato férrico	0,5g	0,5g	0,5
Ágar	15g	14g	15,0
Água destilada	1 litro	1 litro	1 litro
	pH 6,6±0,2 121ºC/15min	pH 6,8±0,2 121ºC/15min	pH 7,1±0,2 121ºC/15min

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e aquecer até a completa fusão do ágar. Distribuir em tubos, esterilizar a 121ºC/15min e inclinar. Opcionalmente, o meio pode ser utilizado

em placas, porém, nesse caso, recomenda-se que o plaqueamento seja feito imediatamente após a esterilização, pois o reaquecimento pode provocar o escurecimento do ágar.

Equivalentes comerciais

Bile Esculin Agar (ACUMEDIA 7249)
Bile Esculin Agar (BBL 299068)
Bile Aesculin Agar (OXOID CM 888)

BS
ÁGAR BISMUTO SULFITO

Aplicação. Meio seletivo diferencial para detecção presuntiva de *Salmonella*.

Composição

Peptona	10g
Extrato de carne	5g
Dextrose	5g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	4g
Sulfito de bismuto	8g
Sulfato ferroso	0,3g
Verde brilhante (2,5ml da solução aquosa 1%)	0,025g
Ágar	20g
Água destilada	1 litro
pH 7,7±0,2	

Preparação. Dissolver os ingredientes e aquecer em banho-maria apenas o tempo necessário para a completa fusão do ágar. Não autoclavar. Distribuir em placas imediatamente, agitando continuamente para suspender o precipitado que normalmente permanece após o aquecimento.
Observação. Os fabricantes recomendam que as placas de BS sejam preparadas no dia do uso, porém, diversos estudos têm demonstrado que o meio recém-preparado é tóxico para várias cepas de *Salmonella*. O BAM/FDA recomenda preparar um dia antes do uso e estocar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Equivalentes comerciais

Bismuth Sulfite Agar (ACUMEDIA 7113)
Bismuth Sulfite Agar (DIFCO 273300)
Bismuth Sulfite Agar (MERCK 1.05418)
Bismuth Sulfite Agar (OXOID CM 201)
Bismuth Sulfite Agar (LABORCLIN 911112) (placas prontas)

CIN
ÁGAR CEFSULODINA IRGASAN NOVOBIOCINA

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento de *Yersinia entercolitica*.

Composição da base	Acumedia 7257	BBL 212309	Difco 218172	Merck 1.16434	Oxoid CM 653
Peptona	-	-	17g	-	-
Proteose peptona	-	-	3g	-	-
Peptona de gelatina (digestão enzimática)	17g	10g	-	-	-
Peptona de caseína (digestão enzimática)***	1,5g	-	-	10g	-
Petona de tecido animal (digestão enzimática)***	1,5g	5g	-	10g	-
Peptona especial	-	-	-	-	20g
Extrato de carne	-	5g	-	-	-
Extrato de levedura	2g	2g	2g	2g	2g
Manitol	20g	20g	20g	20g	20g
Piruvato de sódio	2g	2g	2g	2g	2g
Cloreto de sódio (NaCl)	1g	1g	1g	1g	1g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$)	0,01g	-	0,01g	0,01g	0,01g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4$)	-	0,001g	-	-	-
Desoxicolato de sódio	0,5g	0,5g	0,5g	-	0,5g
Colato de sódio	0,5g	-	0,5g	-	-
Mistura de sais biliares	-	-	-	1g	
Vermelho neutro	0,03g	0,03g	0,03g	0,03g	0,03g
Cristal violeta	0,001g	0,001g	0,001g	0,001g	0,001g
Irgasan	0,004g	0,004g	0,004g	*	*
Ágar	13,5g	12g	13,5g	12,5	12,5g
Água destilada	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro	1 litro
	pH 7,4±0,2 121ºC/15min	pH 7,4±0,2 fervura	pH 7,4±0,2 121ºC/15min	pH 7,4±0,2 121ºC/15min	pH 7,4± 0,2 121ºC/15min

Suplemento

Cefsulodina	4mg/l	4mg/l	4mg/l	15mg/l	15mg/l
Novobiocina	2,5mg/l	2,5mg/l	2,5mg/l	2,5mg/l	2,5mg/l
Irgasan	**	**	**	4mg/l	4mg/l

* crescentado como suplemento.
** Incluído na base.
*** Merck não especifica a forma de hidrólise.

Preparação. Preparar a base, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15 minutos. Resfriar a 55-50ºC e adicionar assepticamente os suplementos, disponíveis comercialmente na forma combinada. Plaquear imediatamente.

Equivalentes comerciais da base

CIN Agar Base (BBL 212309)
Yersinia Selective Agar (ACUMEDIA 7257)
Yersinia Selective Agar Base (DIFCO 218172)
Yersinia Selective Agar Base (OXOID CM 653)
Yersinia Selective Agar Base Schiemann (MERCK 1.16434)

Equivalentes comerciais dos suplementos

Yersinia Antimicrobic Supplement CN (DIFCO 231961)
Yersinia Selective Supplement CIN (MERCK 1.16466)
Yersinia Selective Suplement (OXOID SR 109)

CC
ÁGAR CELOBIOSE COLISTINA

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento de *V. vulnificus* e *V. cholerae* em alimentos.

Composição

Idêntico ao Ágar Celobiose Polimixina Colistina Modificado (m-CPC), sem a polimxina.

m-CPC
ÁGAR CELOBIOSE POLIMIXINA COLISTINA MODIFICADO

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento de *V. vulnificus* e *V. cholerae* em alimentos.

Composição da base

Peptona	10g
Extrato de carne	5g
NaCl	20g
Solução de corantes (azul de bromotimol/vermelho de cresol)*	1ml
Ágar	15g
Água destilada	completar para 900ml
pH 7,6±0,2 - Fervura	

* Dissolver 4g de azul de bromotimol e 4g de vermelho de cresol em 100ml de etanol 95% e estocar sob refrigeração.

Suplementos

Celobiose	10g
Colistina	400.000 unidades
Polimixina B	100.000 unidades
Água destilda	100ml

Preparação. Suspender os ingredientes da base, ajustar o pH 7,6±0,2 e ferver até a fusão do ágar. No autoclavar. Separadamente, dissolver a celobiose em água, aquecendo, porém, sem ferver. Resfriar à temperatura ambiente e adicionar, assépticamente, os antibióticos esterilizados por filtração. Para determinar o peso de antibiótico equivalente ao número de unidades especificado, verificar no frasco a potência do antibiótico adquirido (varia entre as marcas e lotes). Por exemplo, se a potência da polimixina B for 7.900U/mg, significa que cada miligrama tem 7.900 unidades e que são necessárias 12,66mg para 100.000 unidades. Juntar os 100ml de suplementos a cada litro de base, resfriada a 48-55ºC. Plaquear imediatamente, o meio completo não deve ser reaquecido. A coloração deve ser verde-oliva a castanho claro.

Equivalentes comerciais

Não disponível

CFC
ÁGAR CETRIMIDA FUCIDINA CEFALORIDINA

Aplicação: Meio para contagem de *Pseudomonas* spp em carnes e produtos cárneos, método ISO 13720 (1995).

Composição da base

Peptona de gelatina	16g
Hidrolisado de caseína	10g
Sulfato de potássio (K_2SO_4)	10g
Cloreto de magnésio ($MgCl_2$)	1,4g
Ágar	12 a 18g*
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

* A quantidade de ágar depende da capacidade gelificante do material usado.

Suplementos

Solução aquosa 0,1% de cetrimida**	10ml por litro de base
Solução de aquosa 0,1% de fucidina ($C_{31}H_{47}NaO_6$)	10ml por litro de base
Solução aquosa 0,1% de cefaloridina ($C_{19}H_{17}N_3O_4S_2$) – (antibiótico do grupo das cefalosporinas)	50ml por litro de base

** Cetrimida é uma mistura composta predominantemente de brometo de tetradeciltrimetilamônio, acompanhado de pequenas quantidades de brometo de dodeciltrimetilamônio e brometo de cetrimônio.

Preparação: Preparar a base dissolvendo os ingredientes com aquecimento, até a completa fusão do ágar. Esterilizar em autoclave (121ºC/15min), resfriar a 47ºC e adicionar os suplementos, cuja concentração final no meio é de 10mg/l (cetrimida e fucidina) e 50mg/l (cefaloridina). Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido. Estocar sob refrigeração (0-5ºC) por não mais de um mês. **Solução aquosa 0,1% de cetrimida**: dissolver 0,1g em 100ml de água destilada e esterilizar por filtração. Estocar sob refrigeração por não mais de sete dias. **Solução aquosa 0,1% de fucidina**: dissolver 0,1g em 100ml de água destilada e esterilizar por filtração. Estocar sob refrigeração por não mais de sete dias. **Solução aquosa 0,1% de cefaloridina**: dissolver 0,1g em 100ml de água destilada e esterilizar por filtração. Estocar sob refrigeração por não mais de sete dias.

Equivalentes comerciais da base

Pseudomonas Selective Agar Base (Merck 1.07620)
Pseudomonas Agar Base (Oxoid CM 559)

Equivalentes comerciais dos suplementos

Pseudomonas CFC Selective Supplement (Merck 1.07627) (a cefalosporina presente é cefalotina)
CFC Selective Agar Supplement (Oxoid SR 103) (não especifica a cefalosporina presente).

m-CCDA
ÁGAR CHARCOAL CEFOPERAZONA DESOXICOLATO MODIFICADO
(também chamado de Ágar *Campylobacter* Charcoal Diferencial Modificado)

Aplicação. Meio seletivo para isolamento de *Campylobacter*.

Composição da base*

Extrato de carne	10g
Peptona de carne (digestão enzimática)	10g
Peptona de caseína (digestão enzimática)	3g
Cloreto de sódio	5g
Charcoal (carvão) bacteriológico	4g
Desoxicolato de sódio	1g
Sulfato ferroso	0,25g
Piruvato de sódio	0,25g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

*A formulação descrita no BAM/FDA e MLG/FSIS contém ainda 2g/l de extrato de levedura.

Solução de antibióticos

Cefoperazona	32mg
Anfotericina B	10mg
Água destilada	5ml
Esterilizar por filtração	

*A formulação descrita no BAM/FDA contém apenas 2mg/l de anfotericina B e inclui 10mg de rifampicina.

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar a 47-50ºC e adicionar assepticamente, a cada litro de base, 5ml da solução de antibióticos. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido.

Equivalentes comerciais da base

Campylobacter Blood Free Selective Agar Base (MERCK 1.00070)
Campylobacter Blood Free Selective Agar Base (OXOID CM 739)
Campy Blood Free Selective Medium (ACUMEDIA 7527)

Equivalentes comerciais dos suplementos

CCDA Selective Supplement (MERCK 1.00071)
CCDA Selective Supplement (OXOID SR 155)

ÁGAR CITRATO AZIDA

Aplicação. Meio seletivo diferencial para contagem de enterococos em produtos lácteos.

Composição da base

Extrato de levedura	10g
Hidrolizado de caseína (digestão pancreática)	10g
Citrato de sódio	20g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/20min	

Suplementos

Solução aquosa 0,1% de azul de tetrazólio	10ml por litro base
Solução aquosa 4% de azida sódica	10ml por litro base

Preparação. Dissolver os ingredientes da base, fundir o ágar e esterilizar a 121ºC/20min. Resfriar a base a 48ºC e adicionar, a cada litro de base, 10ml da solução aquosa 0,1% de azul de tetrazólio e 10ml da solução aquosa 4% de azida sódica. **Solução aquosa 0,1% de azul de tetrazólio.** Dissolver em água e esterilizar a 121ºC/20min. **Solução aquosa 4% de azida sódica.** Dissolver em água e esterilizar a 121ºC/20min.

Equivalentes comerciais

Não disponível

ÁGAR CITRATO DE SIMMONS

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de citrato.

Composição

Sulfato de magnésio	0,2g
Fosfato de amônia ($NH_4H_2PO_4$)	1g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	1g
Citrato de sódio	2g
Cloreto de sódio	5g
Ágar	15g
Azul de bromotimol (40ml da solução 0,2%)	0,08g
Água destilada	1 litro
pH 6,6±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, fundir o ágar, distribuir em tubos de 10x100mm (4-5ml/tubo), esterilizar a 121ºC/15min e inclinar. **Solução 0,2% de azul de bromotimol.** Dissolver 0,1g em 2,5ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Simmons Citrate Agar (ACUMEDIA 7156)
Simmons Citrate Agar (BBL 211620)
Simmons Citrate Agar (MERCK 1.02501)
Simmons Citrate Agar (OXOID CM 155)

CBA
ÁGAR COLUMBIA SANGUE

Aplicação. Ágar sangue para cultivo de microrganismos fastidiosos, usado para purificação de culturas de *Campylobacter* e obtenção de inóculo para testes de confirmação.

Composição

Ágar Columbia (Base)	1 litro
Sangue de carneiro desfibrinado	50ml

Preparação. Preparar o Ágar Columbia conforme a orientação do fabricante. Resfriar a 47-50ºC, adicionar o sangue de carneiro e misturar. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido.

Equivalentes comerciais da base

Columbia Agar Base (BBL 211124)
Columbia Agar Base (MERCK 1.10455)
Columbia Blood Agr Base (ACUMEDIA 7125)
Columbia Blood Agar Base (DIFCO 279240)
Columbia Blood Agar Base (OXOID CM 331)

Equivalentes comerciais do sangue de carneiro desfibrinado

Sangue de carneiro desfibrinado (LABORCLIN 520209, 521521 ou 520246) (frasco com 15, 20 ou 100 ml

DTA/DTB
ÁGAR (CALDO) DEXTROSE TRIPTONA

Aplicação. Meio para contagem de esporos de bactérias termófilas aeróbias totais, diferencial para termófilos "flat-sour".

Composição do caldo

Triptona	10g
Dextrose	5g
Púrpura de bromocresol (4ml da solução 1%)	0,04g
Água destilada	1 litro
pH 6,7±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar para cada litro de caldo. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 0,1g em 1,9ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Dextrose Casein Peptone Agar (MERCK 1.10860)
Dextrose Tryptone Agar (ACUMEDIA 7340)
Dextrose Tryptone Agar (DIFCO 280100)
Dextrose Tryptone Agar (OXOID CM 75)

DG18
ÁGAR DICLORAN GLICEROL 18

Aplicação. Meio seletivo para isolamento de bolores e leveduras.

Composição

Peptona	5g
Glicose	10g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1g
Sulfato de magnésio	0,5g
Dicloran	0,002g
Cloranfenicol	0,1g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 5,6±0,2 - 121ºC/15min	

Suplemento

Glicerol	220g

Preparação. Suspender os ingredientes da base na água destilada e aquecer até a fusão do ágar. Adicionar o glicerol misturar bem e esterilizar a 121ºC/15min. Distribuir em placas e estocar em geladeira, protegidas contra a luz, para evitar a fotodegradação do rosa de bengala, com formação de compostos inibidores para os bolores e leveduras. **Cuidado**. O cloranfenicol é tóxico e o contato com a pele deve ser evitado.

Equivalentes comerciais

DG18 Agar Base (OXOID CM 729) (não contém cloranfenicol)
Chloramphenicol Selective Supplement (OXOID SR 78) (50mg)
DG18 Agar (MERCK1.00465)

DRBC
ÁGAR DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL

Aplicação. Meio seletivo para isolamento de bolores e leveduras.

Composição

Peptona	5g
Glicose	10g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1g
Sulfato de magnésio	0,5g
Dicloran	0,002g
Rosa de bengala	0,025g
Cloranfenicol	0,1g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 5,6±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes e esterilizar a 121ºC/15min. Estocar as placas em geladeira, protegidas contra a luz, para evitar a fotodegradação do rosa de bengala, com formação de compostos inibidores para os bolores e leveduras. **Cuidado**. O cloranfenicol é tóxico e o contato com a pele deve ser evitado.

Equivalentes comerciais

DRBC Agar (ACUMEDIA 7591)
DRBC Agar (DIFCO 258710)
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (MERCK 1.00466)
DRBC Agar Base (OXOID CM 727) (não contém cloranfenicol)
Chloramphenicol Selective Supplement (OXOID SR 78)
DRBC (LABORCLIN 911230) (placas prontas)

ÁGAR (CALDO) ELLIKER

Aplicação. Meio para contagem de bactérias lácticas.

Composição do caldo

Hidrolisado de caseína (digestão pancreática)	20g
Extrato de levedura	5g
Gelatina	2,5g
Dextrose	5g
Lactose	5g
Sacarose	5g
NaCl	4g
Acetato de sódio	1,5g
Ácido ascórbico	0,5g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Suspender os ingredientes e aquecer em banho sob fervura por um minuto, para a completa dissolução e fusão da gelatina. Esterilizar em autoclave a 121ºC/15min. Para preparar o meio sólido, adicionar 1,5% de ágar e preparar da mesma forma.

Equivalentes comerciais do caldo

Elliker Broth (Difco 212183)

HE
ÁGAR ENTÉRICO DE HECKTOEN

Aplicação. Meio seletivo diferencial para detecção presuntiva de *Salmonella.*

Composição

Proteose peptona	12g
Extrato de levedura	3g
Sais biliares Nº 3	9g
Lactose	12g
Sacarose	12g
Salicina	2g
Cloreto de sódio	5g
Tiossulfato de sódio	5g
Citrato férrico amoniacal	1,5g
Azul de bromotimol (32,5ml da solução 0,2%)	0,065g
Fucsina ácida	0,1g
Ágar	14g
Água destilada	1 litro
pH 7,5±0,2	

Preparação. Dissolver os ingredientes e aquecer em banho, sob constante agitação, até a completa dissolução do ágar. Não autoclavar. Plaquear imediatamente, não deve ser reaquecido. **Solução 0,2% de azul de bromotimol.** Dissolver 0,1g em 2,5ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Hecktoen Enteric Agar (DIFCO 285340)
Hecktoen Enteric Agar (BBL 212211)
Hecktoen Enteric Agar (OXOID CM 419)
Hecktoen Enteric Agar (MERCK 1.11681)
Hecktoen Enteric Agar (ACUMEDIA 7138)
Hecktoen Enteric Agar (LABORCLIN 911212) (placas prontas)

ÁGAR m-ENTEROCOCOS

Aplicação: meio para contagem de estreptococos fecais em água pela técnica da membrana filtrante.

Referência(s): *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 21st Ed. (Eaton *et al.*, 2005), Part 9230C, p.9-89.

Composição

Triptose	20g
Extrato de levedura	5g
Glicose	2g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	4g
Azida sódica (NaN_3)	0,4g
Cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio	0,1g
Ágar	10g
Água destilada	1 litro
pH 7,2 ± 0,2 - Não autoclavar	

Preparação: dissolver os ingredientes, ajustar o pH, adicionar o ágar e aquecer até a completa fusão. Não autoclavar. Distribuir em placas imediatamente, pois não pode ser reaquecido.

EquivalenteComerciais

Membrane Filter *Enterococcus* Selective Agar Base Slanetz & Bartley (Merck 1.05289)
m-*Enterococcus* Agar (Difco 274620)
Slanetz & Bartley Agar (Oxoid CM 377)
m-*Enterococcus* Agar (Acumedia 7544)

YSG
ÁGAR (CALDO) EXTRATO DE LEVEDURA AMIDO GLICOSE

Aplicação: Meio para detecção e contagem de *Alicyclobacillus*, método IFU 12/07.

Composição

Extrato de levedura	2g
Glicose	1g
Amido solúvel	2g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
121ºC/15min	

Preparação. Suspender os ingredientes na água, ferver até a fusão do ágar e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar a 50ºC e ajustar o pH em 3,7 com HCl 1N. Para preparar o caldo, omitir o ágar e ajustar o pH em 3,7 antes da esterilização.

Equivalentes comerciais

YSG Agar (Merck 1.07207)

YEGC
ÁGAR EXTRATO DE LEVEDURA GLICOSE CLORANFENICOL

Aplicação. Meio para contagem de bolores e leveduras, recomendado no Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004) para amostras com predomínio de leveduras ou com leveduras injuriadas pelo processamento.

Composição

Extrato de levedura	5g
Glicose	20g
Solução de cloranfenicol*	1ml
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 6,6±0,2 - 120±1ºC/15min	

* Solução de cloranfenicol. Dissolver assepticamente 500mg de de cloranfenicol em 100ml de tampão fosfato pH 7,2 estéril, estocando a 5ºC por até dois meses. **Cuidado**. O cloranfenicol é altamente tóxico e o contato com a pele deve ser evitado.

Preparação. Suspender os ingredientes na água, na ordem indicada, ferver até a fusão do ágar e esterilizar a 120±1ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Não disponível

MAA
ÁGAR EXTRATO DE MALTE 0,5% ÁCIDO ACÉTICO

Aplicação. Meio para isolamento ou contagem de leveduras resistentes aos conservantes, método Pitt & Hocking (2009).

Referência(s): *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 4th Ed. (Downes & Ito, 2001), *Fungi and Food Spoilage* 3rd Ed. (Pitt & Hocking, 2009).

Composição da base (Ágar extrato de malte)

Extrato de malte	20g
Peptona	1g
Glicose	20g
Ágar	20g
Água destilada	1 litro
121ºC/15min	

Suplemento

Ácido acético glacial	5ml por litro de base

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min. No momento do uso, fundir o ágar, resfriar a 45-50ºC e adicionar o ácido acético glacial, que não precisa ser esterilizado (concentração final 0,5%). O meio completo deve ser utilizado ou plaqueado imediatamente, não podendo ser reaquecido.

Equivalentes comerciais

Não disponível

MEA ANTIBIÓTICOS
ÁGAR EXTRATO DE MALTE COM ANTIBIÓTICOS

Aplicação. Meio para contagem de bolores termorresistentes pelo método da American Public Health Association (APHA), descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001).

Composição da base	Concentração normal	Concentração 1,5	Concentraç ão dupla
Extrato de malte	20g	20g	20g
Dextrose	20g	20g	20g
Peptona	1g	1g	1g
Ágar	20g	20g	20g
Água destilada	1 litro	750ml	500ml
121ºC/15min			

Suplemento

Solução 5mg/ml de antibióticos (clorotetraciclina + cloranfenicol)	20ml/l base (final 100mg/l)	20ml/750ml base (final 150mg/l)	20ml/500ml base (final 200mg/l)

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min. No momento do uso, fundir o ágar, resfriar a 45-50ºC e adicionar a solução de antibióticos previamente preparada. O meio completo deve ser utilizado imediatamente, não podendo ser reaquecido. **Solução de antibióticos 5mg/ml.** Dissolver assepticamente 500mg de clorotetraciclina-HCl e 500mg de cloranfenicol em 100ml de tampão fosfato pH 7,2 estéril, estocando em frasco escuro, sob refrigeração. Uma parte do material sólido permanece em suspensão, devendo ser agitado no momento do uso. **Cuidado**. O cloranfenicol é tóxico e o contato com a pele deve ser evitado.

Equivalentes comerciais

A formulação dos equivalentes comerciais da base (Malt Extract Agar) da Difco, Merck e Oxoid não é igual à descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001), mas esses equivalentes também são recomendados.

MY40G
ÁGAR EXTRATO DE MALTE EXTRATO DE LEVEDURA 40% GLICOSE

Aplicação. Meio para contagem de leveduras osmofílicas.

Referência(s): *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 4th Ed. (Downes & Ito, 2001).

Composição

Extrato de malte	12g
Extrato de levedura	3g
Glicose	400g
Ágar	12g
Água destilada	600g
pH 5,5±0,2 - fervura/30min	

Preparação. Suspender os ingredientes, exceto a glicose, em 550ml de água destilada e aquecer até a fusão do agar. Imediatamente, adicionar água destilada até completar 600g. Com a solução ainda quente, adicionar a glicose com agitação, evitando a formação de grumos (caso se formem, aquecer a solução para dissolver). Ferver por 30min.

Equivalentes comerciais

Não disponível

ÁGAR FENILALANINA DEAMINASE

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de fenilalanina deaminase.

Composição

Extrato de levedura	3g
DL-fenilalanina	2g
Fosfato dipotássico (Na_2HPO_4)	1g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Ágar	12g
Água destilada	1 litro
pH 7,3±0,2 - 121ºC/10min	

Preparação. Suspender os ingredientes, ajustar o pH, aquecer até a fusão do ágar e distribuir em tubos. Esterilizar a 121ºC/10min e inclinar com rampa longa.

Equivalentes comerciais

Phenyalanine Agar (DIFCO 274520)
Phenyalanine Agar (BBL 211537)

LVA
ÁGAR FÍGADO DE VITELA

Aplicação. Meio para crescimento e esporulação de clostrídios.

Composição

Infusão de 50g de fígado bovino	9g
Infusão de 500g de carne de vitela	6,4g
Proteose peptona	20g
Neopeptona	1,3g
Triptona	1,3g
Dextrose	5g
Amido solúvel	10g
Caseína isoelétrica	2g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Nitrato de sódio	2g
Gelatina	20g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,3±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, fundir o ágar e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Liver Veal Agar (DIFCO 259100)

AEY
ÁGAR GEMA DE OVO ANAERÓBICO

Aplicação. Meio diferencial para confirmação de *Yersinia enterocolitica.*

Composição da base

Triptona	5g
Proteose peptona	20g
Extrato de levedura	5g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Ágar	20g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Suplemento

Emulsão gema de ovo:salina (1:1 peso/peso)	80ml/litro base

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar a 45-50ºC e adicionar, assepticamente, a emulsão de gema de ovo previamente preparada. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido. **Emulsão de gema de ovo. M**ergulhar os ovos em etanol 70% por 10 minutos, flambar, abrir assepticamente e tranferir as gemas para um frasco estéril tarado. Adicionar às gemas uma quantidade de solução salina 0,85% estéril, suficiente para diluição 1:1 (peso/peso). Misturar o conteúdo por agitação ou com o auxílio de baguetas estéreis, até obter uma suspensão homogênea (Equivalente comercial da gema: Egg Yolk s/Telurito Laborclin 520088).

Equivalentes comerciais da base

Não disponível

FGTC
ÁGAR GENTAMICINA TÁLIO CARBONATO FLUOROGÊNICO

Aplicação. Meio seletivo/diferencial para contagem de enterococos em alimentos.

Composição

Ágar Tripticase de Soja (TSA)	40g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	5g
Amilose azure	3g
Galactose	1g
Acetato de tálio (ácido acético, sal de tálio)	0,5g
Tween 80	0,75ml
4-metilumbeliferil-β-D-galactosídeo	100mg
Sulfato de gentamicina (2,5ml da solução aquosa 0,1%)	2,5mg
Água destilada	1 litro
121ºC/15min	

Suplemento

Solução aquosa 10% de carbonato de sódio	20ml/litro base
aquecer até a fervura	

Preparação. Dissolver os ingredientes em água destilada e esterilizar a 121ºC/15 minutos. Não é necessário ajustar o pH, que será elevado ao valor correto pela posterior adição do carbonato de sódio. **Cuidado.** Os sais de tálio são extremamente tóxicos quando inalados ou ingeridos, devendo ser manuseados com luvas e máscara. Após a esterilização, resfriar o meio a 55-50ºC e adicionar assepticamente, para cada litro de meio, 20ml de uma solução aquosa 10% de carbonato de sódio previamente preparada. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido. **Solução 0,1% de sulfato de gentamicina.** Dissolver assepticamente 0,1g em 100ml de água destilada estéril e estocar em frasco escuro, por até 3 meses, sob refrigeração. **Solução aquosa 10% de carbonato de sódio.** Preparar no dia do uso e pasteurizar aquecendo até a fervura, antes de usar.

Equivalentes comerciais

Não disponível

ÁGAR GLICOSE

Aplicação: Meio para confirmação de *Pseudomonas* spp em leite e produtos lácteos, método ISO 11059:2009.

Referência(s): ISO 11059:2009.

Composição

Peptona de caseína (digestão enzimática)	10g
Extrato de levedura	1,5g
Cloreto de sódio	5g
Glicose	10g
Púrpura de bromocresol (1,5ml da solução 1%)	0,015g
Ágar	12 a 18g*
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

* A quantidade de ágar depende da capacidade gelificante do material usado.

Preparação. Suspender os ingredientes e aquecer até a completa fusão do ágar. Distribuir em tubos (10ml/tubo) e esterilizar em autoclave (121ºC/15min). Resfriar sem inclinar. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 0,1g em 2ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Não disponível (o Ágar Púrpura Base para Carboidratos é similar mas não idêntico)

BHIA/BHI
ÁGAR (CALDO) INFUSÃO CÉREBRO CORAÇÃO

Aplicação. Meio de enriquecimento e manutenção para uso geral.

Composição do caldo

Infusão de 200g de cérebro de bezerro (sólidos)	7,7g
Infusão de 250g de coração de boi (sólidos)	9,8g
Proteose peptona	10g
Dextrose	2g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	2,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar para cada litro de caldo.

Equivalentes comerciais do caldo

Brain Heart Broth (MERCK 1.10493)
Brain Heart Infusion (BACTO 237500)
Brain Heart Infusion (BBL 211059)
Brain Heart Infusion (OXOID CM 225)
Brain Heart Infusion Broth (ACUMEDIA 7116)

Equivalentes comerciais do ágar

Brain Heart Agar (MERCK 1.13825)
Brain Heart Infusion Agar (ACUMEDIA 7115)
Brain Heart Infusion Agar (BBL 211065)
Brain Heart Infusion Agar (DIFCO 241830)
Brain Heart Infusion Agar (OXOID CM 375)

ESIA
ÁGAR DE ISOLAMENTO DE *ENTEROBACTER SAKAZAKII*

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento de *Enterobacter sakazakii*, método ISO 22964 (2006).

Composição da base

Peptona	7g
Extrato de levedura	3g
NaCl	5g
Desoxicolato de sódio	0,6g
Cristal violeta	2mg
Ágar	12 a 18g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Suplemento estéril

Solução 1,5% de X-Alfa-Glicosídeo (5-bromo-4-cloro-3indolil-α-D-glicopiranosídeo)	10ml/litro de base

Preparação. Dissolver os ingredientesda base, ajustar o pH, aquecer até a fusão do ágar e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar a 45-49ºC e adicionar, para cada litro de meio base, 10ml de solução de X-Alfa-Glicosídeo esterilizada por filtração. Misturar bem e plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido. Estocar sob refrigeração (0-5ºC) por até 14 dias. **Solução 1,5% de X-Alfa-Glicosídeo.** Dissolver 0,15g de 5-bromo-4-cloro-3indolil-α-D-glicopiranosídeo em 10ml de dimetilformamida e esterilizar por filtração.

Equivalentes comerciais

ESIA (*Enterobacter sakazakii* Isolation Agar) (AES Laboratoire)

AGAR K

Aplicação. Meio para isolamento de *Alicyclobacillus.*

Composição

Extrato de levedura	2,5g
Peptona	5g
Glicose	1g
Tween 80	1g
Ágar	15g
Água destilada	990ml
121°C/15min	

Preparação. Suspender os ingredientes, fundir o ágar e esterilizar a 121°C/15min. Resfriar a aproximadamente 55°C e ajustar o pH em 3,7 com uma solução aquosa 25% de ácido málico esterilizada por filtração (1ml de ácido/100ml do meio). Após acidificação o meio não pode ser reaquecido. Utilizar no intervalo de três horas, para inoculação em profundidade, ou distribuir em placas de Petri para inoculação em superfície.

Equivalentes comerciais

O método IFU 12/07 (Capítulo 22) cita o equivalente comercial da Biotrace International BioProducts, Código BP-0234-500, site <http://www.intlbioproducts.com>

KF
ÁGAR KF STREPTOCOCCUS

Aplicação. Meio seletivo para contagem de enterococos.

Proteose peptona	10g
Extrato de levedura	10g
NaCl	5g
Glicerofosfato de sódio	10g
Maltose	20g
Lactose	1g
Azida de sódio	0,4g
Púrpura de bromocresol (1,5ml da solução 1%)	0,015g
Ágar	20g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - fervura/5min	

Suplemento estéril

Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (10ml da solução aquosa 1%)	100mg/litro de base

Preparação. Dissolver os ingredientesda base, ajustar o pH, aquecer até a fusão do ágar e continuar a fervura por 5min. Resfriar a 50-60°C e adicionar, para cada 100ml de meio base, 10ml de solução

aquosa 1% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, esterilizada por filtração. Plaquear imediatamente, o meio não deve ser reaquecido. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 0,1g em 1,9ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais da base

KF Streptococcus Agar (DIFCO 249610)
KF Streptococcus Agar (OXOID CM 701)
KF Streptococcus Agar (MERCK 1.10707)
KF Streptococcus Agar (ACUMEDIA 7610)

KG
ÁGAR KIM-GOEPFERT

Aplicação. Meio seletivo diferencial para a contagem de *B. cereus*.

Composição da base

Peptona	1g
Extrato de levedura	0,5g
Vermelho de fenol (12,5ml da solução 0,2%)	0,025g
Ágar	18g
Água destilada	900ml
pH 6,8±0,2 - 121ºC/20min	

Suplementos

Solução de sulfato de polimixina B (10.000IU/ml)	10ml/900ml base
Emulsão gema de ovo:salina (1:1)	100ml/900ml base

Solução 0,2% de vermelho de fenol. Dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada. **Solução de sulfato de polimixina B 10.000IU/ml.** Dissolver 500.000 unidades do sulfato de polimixina em 50ml de água destilada, esterilizar por filtração e estocar sob refrigeração. Para determinar o peso de polimixina necessário para 500.000 unidades, verificar no frasco a potência da polimixina adquirida (varia entre as marcas e lotes). Por exemplo, se a potência for 7.900U/mg, significa que cada miligrama tem 7.900 unidades e que são necessárias 63,29mg para 500.000 unidades. **Emulsão de gema de ovo.** Mergulhar os ovos em etanol 70% por 10 minutos, flambar, abrir assepticamente e tranferir as gemas para um frasco estéril tarado. Adicionar às gemas uma quantidade de solução salina 0,85% estéril, suficiente para diluição 1:1. Misturar o conteúdo por agitação ou com o auxílio de baguetas estéreis, até obter uma suspensão homogênea.

Equivalentes comerciais da base

Não disponível

Equivalentes comerciais dos suplementos

Antimicrobic Vial P (Polymyxin B) (DIFCO 232681)
Bacillus cereus Selective Supplement (MERCK 1.09875)
Bacillus cereus Selective Supplement (OXOID SR99)
Egg Yolk Emulsion (MERCK 1.03784)

Egg Yolk Emulsion (OXOID SR 47)
Egg Yolk Enrichment 50% (DIFCO 233472)
Egg Yolk s/Telurito (LABORCLIN 520088)

KIA
ÁGAR KLIGLER FERRO

Aplicação. Meio para prova bioquímica, testes de utilização da sacarose e/ou lactose e produção de H_2S.

Composição

Extrato de carne	3g
Extrato de levedura	3g
Peptona	15g
Proteose peptona	5g
Lactose	10g
Dextrose	1g
Sulfato ferroso	0,2g
NaCl	5g
Tiossulfato de sódio	0,3g
Vermelho de fenol (12ml da solução 0,2%)	0,024g
Ágar	12g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121°C/15min	

Preparação: dissolver os ingredientes, ajustar o pH em 7,4 e aquecer até a completa fusão do ágar. Distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo) e esterilizar a 121°C/15min. Inclinar de forma a obter fundo com no mínimo 2,5cm de comprimento. **Solução 0,2% de vermelho de fenol**: dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes Comerciais

Kligler Iron Agar (MERCK 1.03913)
Kligler Iron Agar (OXOID CM 33)
Kligler Iron Agar (BBL 211317)
Kligler Iron Agar (Acumedia 7140)

PRY
ÁGAR LEVEDURAS RESISTENTES AOS CONSERVANTES
(PRESERVATIVE RESISTANT YEASTS MEDIUM)

Aplicação. Meio para isolamento ou contagem de leveduras resistentes aos conservantes, método da 4ª edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DiGiacomo & Gallagher, 2001).

Referência(s): *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 4th Ed. (Downes & Ito, 2001).

Composição da base

Manitol	10g
Extrato de levedura	10g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
121ºC/15min (não é necessário ajustar o pH)	

Suplemento

Ácido acético glacial	10ml por litro de base

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min. No momento do uso, fundir o ágar, resfriar a 45-50ºC e adicionar o ácido acético, que não precisa ser esterilizado (concentração final 1%). O meio completo deve ser utilizado ou plaqueado imediatamente, não podendo ser reaquecido.

Equivalentes comerciais

Não disponível

L-EMB
ÁGAR LEVINE EOSINA AZUL DE METILENO

Aplicação. Meio seletivo/diferencial para detecção presuntiva de *E.coli.*

Composição

Peptona	10g
Lactose	10g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	2g
Eosina amarela	0,4g
Azul de metileno	0,065g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,1±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Distribuir em placas imediatamente, pois não pode ser reaquecido.

Equivalentes comerciais

Eosin Methylene Blue Agar Levine (ACUMEDIA 7103)
Eosin Methylene Blue Agar Levine (OXOID CM 69)
Levine Eosin Methylene Blue Agar (BBL 211221)

LAIA
ÁGAR LISINA ARGININA FERRO

Aplicação. Meio para provas bioquímicas, teste de descarboxilação da lisina e arginina e teste de produção de H_2S.

Composição

L-Arginina	10g
Ágar Lisina Ferro (LIA)	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Suspender o LIA na água, conforme orientação do fabricante, suplementar com o aminoácido L-arginina, fundir o ágar e distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo). Esterilizar a 121ºC/15min e inclinar, mantendo fundo de 2,5cm.

Equivalentes comerciais

Completo não disponível
Sem a arginina, vide Ágar Lisina Ferro (LIA)

LIA
ÁGAR LISINA FERRO

Aplicação. Meio para provas bioquímicas, teste de descarboxilação da lisina e teste de produção de H_2S.

Composição

Peptona	5g
Extrato de levedura	3g
Dextrose	1g
Cloridrato de L-Lisina	10g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Tiossulfato de sódio	0,04g
Púrpura de bromocresol (2ml de solução 1%)	0,02g
Agar	15g
Água destilada	1 litro
pH 6,7±0,2 - 121ºC/15 min	

Preparação. Dissolver os ingredientes , fundir o ágar, distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo), esterilizar a 121ºC/15min e inclinar, mantendo fundo de 2,5cm, no mínimo, porque a reação de descarboxilação da lisina é mais eficiente em condições anaeróbias. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 1g em 1,9ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Lysine Iron Agar (ACUMEDIA 7211)
Lysine Iron Agar (BBL 211363)

Lysine Iron Agar (DIFCO 284920)
Lysine Iron Agar (MERCK 1.11640)
Lysine Iron Agar (OXOID CM 381)

DM-LIA
ÁGAR LISINA FERRO DUPLAMENTE MODIFICADO

Aplicação. Meio seletivo diferencial recomendado pelo MLG/FSIS para isolamento presuntivo de *Salmonella*.

Composição da base

Ágar Lisina Ferro (LIA)	34g
Sais biliares Nº 3	1,5g
Lactose	10g
Sacarose	10g
Tiosulfato de sódio	6,76g
Citrato férrico amoniacal	0,3g
Água destilada	1 litro
pH 6,7±0,2 – aquecer até a fervura	

Suplemento

Novobiocina (3ml da solução 0,5%)	0,015g/l base

Preparação. Suspender os ingredientes da base, ajustar o pH e aquecer até fervura e fusão do ágar. Não autoclavar. Resfriar a base a aproximadamente 50ºC e adicionar, a cada litro de base, 3ml da solução 0,5% de novobiocina. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido. S**olução 0,5% de novobiocina.** Dissolver 0,05g de novobiocina (sal sódico) em 10ml de destilada e esterilizar por filtração. Estocar por até 4 semanas a 3±2ºC.

Equivalentes comerciais do LIA (completo não disponível)
Lysine Iron Agar (DIFCO 284920)
Lysine Iron Agar (BBL 211363)
Lysine Iron Agar (MERCK 1.11640)
Lysine Iron Agar (OXOID CM 381)
Lysine Iron Agar (ACUMEDIA 7211)

ALOA
ÁGAR LISTERIA OTTAVIANI & AGOSTI

Aplicação. Meio seletivo diferencial para contagem ou detecção de *Listeria monocytogenes.*

Composição da base

Peptona de tecido animal digestão enzimática	18g
Peptona de caseína digestão enzimática	6g
Extrato de levedura	10g
Piruvato de sódio	2g
Glicose	2g
Glicerofosfato de magnésio	1g
Sulfato de magnésio anidro	0,5g
Cloreto de sódio	5g
Cloreto de lítio	10g
Fosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)	2,5g
X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicopiranisídeo)	0,05g
Ágar	12-18g*
Água destilada	930ml
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

* A quantidade de ágar depende da capacidade gelificante do material usado.

Suplementos seletivos estéreis

L-α-fosfatidilinositol (Sigma P 6636 ou equivalente) (50ml da solução aquosa 4%)	2g/l
Ácido nalidíxico (sal sódico) (5ml da solução 0,4% em NaOH 0,05 mol/L)	0,02g/l
Ceftazidima (5ml da solução aquosa 0,4%)	0,02g/l
Sulfato de polimixina B (7,67ml da solução aquosa 10.000 IU)	76.700 unidades
Cicloeximida (5ml da solução 1%)	0,05g/l

Preparação: Preparar a base dissolvendo os ingredientes com aquecimento, até a completa fusão do ágar. Esterilizar em autoclave (121ºC/15min), resfriar a 50ºC e adicionar os suplementos. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido. A aparência deve ser opaca. Estocar sob refrigeração por não mais de um mês. **Solução aquosa 4% de L-α-fosfatidilinositol:** dissolver 2g em 50ml de água destilada fria e agitar em agitador magnético por 30min, de forma a obter uma suspensão homogênea. Esterilizar a 121ºC/15min e resfriar. **Solução 0,4% de ácido nalidíxico**: dissolver 0,02g do ácido nalidíxico (sal sódico) em 5ml de NaOH 0,05 mol/L e esterilizar por filtração. **Solução aquosa 0,4% de ceftazidima**: dissolver 0,02g em 5ml de água destilada e esterilizar por filtração. **Solução 1% de cicloeximida**: dissolver 0,05g em 2,5ml de etanol, adicionar 2,5ml de água destilada e esterilizar por filtração. **Solução de sulfato de polimixina B 10.000IU/ml**: dissolver 500.000 unidades do sulfato de polimixina em 50ml de água destilada, esterilizar por filtração e estocar sob refrigeração. Para determinar o peso de polimixina necessário para 500.000 unidades, verificar no frasco a potência da polimixina adquirida (varia entre as marcas e lotes). Por exemplo, se a potência for 7.900 IU/mg, significa que cada miligrama tem 7.900 unidades e que são necessárias 63,29mg para 500.000 unidades.

Equivalentes comerciais da base

Chromogenic Listeria Agar (ISO) (Oxoid CM1084)

Chromocult® *Listeria* Selective Agar Base acc. to Agosti and Ottaviani (ALOA) (Merck 1.00427)

Equivalentes comerciais dos suplementos

OCLA (ISO) Differential Supplement (Oxoid SR0244) (L-α-phosphatidylinositol)
OCLA (ISO) Selective Supplement (Oxoid SR0226) (antibióticos)
Listeria Agar Enrichment Supplement (Merck 1.00439.0010) (L-α-phosphatidylinositol)
Listeria Agar Selective Supplement (Merck 1.00432) (antibióticos)

ÁGAR MacCONKEY

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento de enterobactérias.

Composição

Peptona	20g
Lactose	10g
Sais biliares Nº 3	1,5g
NaCl	5g
Vermelho neutro	0,03g
Cristal violeta	0,001g
Ágar	13,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,1±0,2 - 121ºC/15min	

Equivalentes comerciais

MacConkey Agar (ACUMEDIA 7102)
MacConkey Agar (BBL 211387)
MacConkey Agar (DIFCO 212123)
MacConkey Agar (MERCK 1.05465)
MacConkey Agar Nº 3 (OXOID CM 115)

TC-SMAC
ÁGAR MacCONKEY SORBITOL TELURITO CEFIXIMA

Aplicação. Meio de plaqueamento seletivo diferencial para a detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos, método BAM/FDA (Feng & Weagant, 2002).

Composição da base

Ágar MacConkey Sorbitol (base)	1 litro
pH 7,1±0,2 - 121ºC/15min	

Suplementos esterilizados por filtração

Cefixima	0,05mg/litro base
Telurito de potássio	2,5mg/litro base

Preparação. Dissolver os ingredientes da base, ajustar o pH em 7,1±0,2 e esterilizar a121ºC/15min. Resfriar a 45-50ºC e adicionar os suplementos pré esterilizados por filtração. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido.

Equivalentes comerciais da base

MacConkey II Agar with Sorbitol (BBL 299769)
MacConkey Sorbitol Agar (Difco 279100)
MacConkey w/ Sorbitol (ACUMEDIA 7320)
Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid CM 813)

Equivalentes comerciais dos suplementos

Cefixime-Tellurite Selective Supplement (Oxoid SR0172)
CT-Supplement (MERCK 1.09202)

MYP
ÁGAR MANITOL GEMA DE OVO POLIMIXINA

Aplicação. Meio seletivo/diferencial para isolamento presuntivo de *Bacillus cereus.*

Composição da base

Extrato de carne	1g
Peptona	10g
D-Manitol	10g
Cloreto de sódio	10g
Vermelho de fenol (12,5ml da solução 0,2%)	0,025g
Agar	15g
Água destilada	completar 900ml
pH 7,1±0,2 - 121ºC/20min	

Suplemento

Solução de sulfato de polimixina B 10.000IU/ml	10ml/900ml base
Emulsão gema de ovo:salina (1:1)	100ml/900ml base

Preparação. Esterilizar a base a 121ºC/20min, resfriar a 45-50ºC, adicionar assepticamente os suplementos préviamente preparados e plaquear imediatamente, pois o meio completo não pode ser reaquecido. **Solução 0,2% de vermelho de fenol.** Dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada. **Solução de sulfato de polimixina B 10.000IU/ml.** Dissolver 500.000 unidades do sulfato de polimixina em 50ml de água destilada, esterilizar por filtração e estocar sob refrigeração. Para determinar o peso de polimixina necessário para 500.000 unidades, verificar no frasco a potência da polimixina adquirida (varia entre as marcas e lotes). Por exemplo, se a potência for 7.900U/mg, significa que cada miligrama tem 7.900 unidades e que são necessárias 63,29mg para 500.000 unidades. **Emulsão de gema de ovo.** Mergulhar os ovos em etanol 70% por 10 minutos, flambar, abrir assepticamente e tranferir as gemas para um frasco estéril tarado. Adicionar às gemas uma quantidade de solução salina 0,85% estéril, suficiente para diluição 1:1. Misturar o conteúdo por agitação ou com o auxílio de baguetas estéreis, até obter uma suspensão homogênea.

Equivalentes comerciais da base

MYP Agar (DIFCO 281010)
MYP Agar (MERCK 1.05267)
MYP Agar (OXOID CM 0929)

Equivalentes comerciais dos suplementos

Antimicrobic Vial P (Polymyxin B) (DIFCO 232681)
Bacillus cereus Selective Supplement (MERCK 1.09875)
Bacillus cereus Selective Supplement (OXOID SR99)
Egg Yolk Emulsion (MERCK 1.03784)
Egg Yolk Emulsion (OXOID SR 47)
Egg Yolk Enrichment 50% (DIFCO 233472)
Egg Yolk s/Telurito (LABORCLIN 520088)

Equivalentes comerciais do meio completo (placas prontas)

MYP Agar (LABORC LIN 910937)

ÁGAR m-HPC

Aplicação. Meio para contagem de bactérias heterotróficas em água pela técnica da membrana filtrante.

Composição

Peptona	20g
Gelatina	25g
Glicerol	10ml
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,1±0,2 - 121°C/5min	

Preparação. Misturar os ingredientes, exceto o glicerol, e ajustar o pH em 7,1±0,2 com NaOH 1N. Aquecer até fusão do ágar, adicionar o glicerol, esterilizar em autoclave a 121°C/5min e distribuir em placas.

Equivalentes comerciais

m-HPC Agar (Difco 275220) (sem glicerol)
Glycerol (Difco 228210/228220)

MRS
ÁGAR (CALDO) DE MAN ROGOSA & SHARPE

Aplicação. Meio para cultivo de bactérias láticas.

Composição do caldo

Peptona	10g
Extrato de carne	8g
Extrato de levedura	4g
Glicose	20g

Continuação

Sorbitano monooleato	1g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	2g
Acetato de sódio.$3H_2O$	5g
Citrato de amônia	2g
Sulfato de magnésio.$7H_2O$	0,2g
Sulfato de manganês.$4H_2O$	0,05g
Água destilada	1 litro
pH 6,2±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar para cada litro de caldo.

Equivalentes comerciais

Lactobacilli MRS Agar (ACUMEDIA 7543)
Lactobacilli MRS Agar (DIFCO 288210)
Lactobacilli MRS Broth (ACUMEDIA 7406)
Lactobacilli MRS Broth (DIFCO 288130)
MRS Agar (MERCK 1.10660)
MRS Broth (MERCK 1.10661)
MRS Agar (OXOID CM 361)
MRS Broth (OXOID CM 359)
MRS Agar (LABORCLIN 900083) (meio pronto em frasco com 250ml)

Modificações

Ágar MRS Acidificado. A acidificação é feita adicionado-se ácido acético glacial estéril ao ágar MRS já esterilizado, fundido e resfriado, até que o pH chegue a 5,4±0,2.
Ágar MRS Acidificado 1% Frutose. Preparar o meio adicionando 10ml de uma solução aquosa 10% de frutose (esterilizada por filtração) a 100ml do ágar MRS (estéril, fundido e resfriado) e ácido acético glacial estéril até que o pH chegue a 5,4±0,2.
Ágar MRS 0,1% Ácido Sórbico. Para a preparação do meio, ajustar o pH do MRS (estéril, fundido e resfriado) em 5,7±0,1, com ácido clorídrico 5N. Adicionar então o ácido sórbico (dissolvido em NaOH), na quantidade necessária para concentração final 0,1%.
Ágar MRS 0,1% Cisteína 0,02% Ácido Sórbico. Para a preparação do meio, suplementar o MRS com 0,1% de cloridrato de cisteína (cisteína-HCl) e esterilizar. Ajustar o pH do meio estéril, fundido e resfriado em 5,7±0,1, com ácido clorídrico. Adicionar então o ácido sórbico (dissolvido em NaOH), na quantidade necessária para concentração final 0,02%.
Ágar MRS 0,5% Frutose. A suplementação é feita adicionando-se 5ml de uma solução aquosa 10% de frutose (esterilizada por filtração) a 100ml do ágar MRS estéril, fundido e resfriado.
Ágar MRS Modificado. Preparado adicionando-se 0,01% de TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólium) ao Ágar MRS.

ÁGAR MOTILIDADE PARA *BACILLUS CEREUS*

Aplicação. Meio teste de motilidade para cepas de *B. cereus.*

Composição

Tripticase	10g
Extrato de levedura	2,5g
Glicose	5g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	2,5g
Ágar	3g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, aquecer até a completa fusão do ágar, distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo) e esterilizar a 121°C/15min. Não inclinar, o meio deve solidificar na posição vertical. Recomenda-se usar no mesmo dia ou desaerar antes do uso, fervendo em banho por 15min com as tampas desrosqueadas e resfriando imediatamente em banho de gelo.

Equivalentes comerciais

Motilidade B. *cereus* (LABORCLIN 910077) (meio pronto em tubos)

ÁGAR MUELLER HINTON 5% SANGUE

Aplicação. Ágar sangue usado no teste de sensibilidade à cefalotina e ao ácido nalidíxico para identificação de *Campylobacter*.

Composição

Ágar Mueller Hinton (Base)	1 litro
Sangue de carneiro desfibrinado	50ml

Preparação. Preparar o Ágar Mueller Hinton conforme a orientação do fabricante. Resfriar a 47-50°C, adicionar o sangue de carneiro e misturar. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido.

Equivalentes comerciais da base

Mueller Hinton Agar (Acumedia 7101)
Mueller Hinton Agar (BBL 211438)
Mueller Hinton Agar (Difco 225250)
Mueller Hinton Agar (Merck 1.05435)
Mueller Hinton Agar (Oxoid CM 337)

Equivalente s comerciais do sangue

Sangue de carneiro desfibrinado (LABORCLIN 520209, 521521 ou 520246) (frasco com 15, 20 ou 100 ml)

ÁGAR NITRATO MOTILIDADE

Aplicação. Meio para provas bioquímicas, teste de redução do nitrato e teste de motilidade para *Clostridium perfringens*.

Composição

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Nitrato de potássio	1g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	2,5g
Galactose	5g
Glicerol	5ml
Ágar	3g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, exceto o ágar, e ajustar o pH em 7,4. Adicionar o ágar, fundir, distribuir em tubos de 16x150mm (13ml/tubo), esterilizar a 121ºC/15min e resfriar sem inclinar. Se não for utilizado dentro de quatro horas, desaerar antes do uso, fervendo em banho por 15min com as tampas desrosqueadas e resfriando imediatamente em banho de gelo.

Equivalentes comerciais

Motilidade Nitrato (LABORCLIN 910401) (meio pronto em tubos)

NA/NB
ÁGAR (CALDO) NUTRIENTE

Aplicação. Meio de uso geral para manutenção de culturas de bactérias.

Composição do caldo

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar para cada litro de meio.

Equivalentes comerciais

Lab-Lemco Agar (OXOID CM 17)
Lab-Lemco Broth (OXOID CM 15)
Nutrient Agar (ACUMEDIA 7145)
Nutrient Agar (DIFCO 213000)
Nutrient Agar (MERCK 1.05450)
Nutrient Broth (ACUMEDIA 7146)
Nutrient Broth (DIFCO 234000)
Nutrient Broth (MERCK 1.05443)
Nutrient Agar (LABORCLIN 912006) (placas prontas)

Modificações

Ágar Nutriente Azul de Tripano 0,015g/l. Meio para contagem de esporos de mesófilos aeróbios em água. É preparado suplementando o Ágar Nutriente com 0,015g/l de azul de tripano, antes da esterilização. O pH final deve ser 6,8±0,2 e pode ser estocado em geladeira (4 a 8°C) por 20 dias.

Ágar Nutriente Lisozima 0,001%. Meio para verificação da capacidade de crescimento na presença de lisozima, para confirmação de *B. cereus*. Preparar o caldo nutriente e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar e adicionar assepticamente, para cada 99ml de caldo, 1ml de solução de lisozima 0,1%, distribuindo em tubos estéreis. **Solução 0,1% de lisozima.** Dissolver 0,1g de lisozima em 65ml de HCl 0,01N, ferver por 20 minutos e completar assepticamente o volume para 100ml, com HCl 0,01N estéril. Alternativamente, preparar uma solução aquosa 0,1% de cloreto de lisozima e esterilizar por filtração.

Ágar Nutriente Manganês. Meio para esporulação de *Bacillus*, usado no teste de esterilidade comercial. É preparado suplementando o Ágar Nutriente com sulfato de manganês (solução aquosa 3%, 1ml/l de meio), antes da esterilização.

ÁGAR NWRI (HPCA)

Aplicação. Meio para contagem de bactérias heterotróficas em água.

Composição

Peptona	3g
Caseína solúvel	0,5g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	0,2g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4$)	0,05g
Cloreto férrico ($FeCl_3$)	0,001g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121°C/15min	

Preparação. Misturar os ingredientes e ajustar o pH em 7,2±0,2. Aquecer até fusão do ágar, esterilizar em autoclave a 121°C/15min e distribuir em placas.

Equivalentes comerciais

Não disponível

OXA - ÁGAR OXFORD
MOX - ÁGAR OXFORD MODIFICADO

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento de *L.monocytogenes*.

Composição da base (OXA e MOX)

Peptona	23g
Amido	1g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0
Esculina	1g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Cloreto de lítio	15g
Ágar	13g
Água destilada	
pH 7,0±0,2 121ºC/15min	

Suplemento estéril OXA

Cicloeximida	400mg/l base
Sulfato de colistina	20mg/l base
Acriflavina	5mg/l base
Cefotetan	2mg/l base
Fosfomicina	10mg/l base

Suplemento estéril MOX

Sulfato de colistina	10mg/l base
Moxalactam	20mg/l base

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar a 50-60ºC e adicionar assepticamente o suplemento estéril, disponível comercialmente na forma liofilizada. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido.

Equivalentes comerciais da base

Listeria Selective Agar (Oxford Formulation OXOID CM 856)
Oxford *Listeria* Agar Base (ACUMEDIA 7428)
Oxford *Listeria* Selective Agar Base (MERCK 1.07004)
Oxford Medium Base (DIFCO 222530)
Oxford Ágar p/ Listeria Base (LABORCLIN 900086) (base pronta em frasco de 200ml)

Equivalentes comerciais dos suplementos do OXA

Listeria Selective Supplement (Oxford Formulation OXOID SR 140)
Oxford Antimicrobic Supplement (DIFCO 211755)
Oxford *Listeria* Selective Supplement (MERCK 1.07006)

Equivalentes comerciais dos suplementos do MOX

Modified Oxford Antimicrobic Supplement (DIFCO 211763)

Equivalentes comerciais do MOX completo em placas prontas

MOX Ágar p/ Listeria (LABORCLIN 910014)

PCA
ÁGAR PADRÃO PARA CONTAGEM

Aplicação. Meio de enriquecimento para contagem total de microrganismos em placas, ou para manutenção de culturas de bactérias.

Composição

Triptona	5g
Extrato de levedura	2,5g
Dextrose	1g
Agar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Equivalentes comerciais

Plate Count Agar (DIFCO 247940)
Plate Count Agar (MERCK 1.05463)
Plate Count Agar (OXOID CM 325)
Standard Methods Agar (BBL 211638)
Standard Methods Agar (ACUMEDIA 7157)
PCA (Plate Count Agar) (BIOCEN DO BRASIL 4012) (placas prontas)
Plate Count Agar (LABORCLIN 542566) (placas prontas)
Plate Count Agar (LABORCLIN 910107) (meio pronto em frasco com 100ml)

Modificações

Ágar Padrão para Contagem (PCA) suplementado com 0,1% de amido solúvel. Recomendado para a contagem de esporos de bactérias mesófilas aeróbias, método descrito no item 8.090 do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004). Para a preparação do meio, adicionar 1g de amido solúvel a um litro de PCA, antes da esterilização.
Ágar Padrão para Contagem suplementado com 100mg/l de cloranfenicol. Recomendado para a contagem de fungos psicrotróficos no método da American Public Health Association (APHA), descrito no Capítulo 13 da 4ª Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001). Para a preparação do meio, adicionar 100mg de cloranfenicol a um litro de PCA (20ml da solução 0,5%), antes da esterilização. **Solução 0,5% de cloranfenicol.** Dissolver assepticamente 500mg de cloranfenicol em 100ml de tampão fosfato pH 7,2 estéril e armazenar em frasco escuro, sob refrigeração. **Cuidado**. O cloranfenicol é tóxico e o contato com a pele deve ser evitado. Adicionar 20ml dessa solução para cada litro de meio a ser preparado.

PPA
ÁGAR PENICILINA PIMARICINA

Aplicação: Meio para contagem de *Pseudomonas* spp em leite e produtos lácteos, método ISO 11059:2009.

Composição da base (a mesma do Ágar Cetrimida Fucidina Cefaloridina)

Peptona de gelatina (digestão enzimática)	16g
Peptona de caseína (digestão enzimática)	10g
Sulfato de potássio (K_2SO_4)	10g
Cloreto de magnésio ($MgCl_2$)	1,4g
Ágar	12 a 18g*
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

* A quantidade de ágar depende da capacidade gelificante do material usado.

Suplementos

Solução aquosa 10^5 IU/ml de penicilina G (sal potássico)	1ml por litro de base
Solução de aquosa 1% de pimaricina (natamicina)	1ml por litro de base

Preparação: Preparar a base dissolvendo os ingredientes com aquecimento, até a completa fusão do ágar. Esterilizar em autoclave (121ºC/15min), resfriar a 47ºC e adicionar os suplementos, cuja concentração final no meio é de 100.000 IU/l (penicilina G) e 0,01g/l (pimaricina). Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser reaquecido. Estocar as placas sob refrigeração (5±3ºC), ao abrigo da luz, por não mais de um dia. **Solução aquosa de penicilina G:** dissolver 10^6 unidades em 10ml de água destilada e esterilizar por filtração. Estocar sob refrigeração (5±3ºC) por até uma semana ou em alíquotas congeladas (-20ºC) por até seis meses. **Solução aquosa 1% de pimaricina:** dissolver 0,1g em 10ml de água destilada e esterilizar a 110ºC/20min. A solução não é estável e deve ser mantida ao abrigo da luz. Usar no mesmo dia da preparação ou estocar em alíquotas congeladas (-20ºC) por até seis meses.

Equivalentes comerciais da base

Não disponível

AGAR PIRAZINAMIDASE

Aplicação. Meio para teste de atividade da enzima pirazinamidase, usado na confirmação de *Y. enterocolitica*.

Composição

Ágar Tripticase de Soja (TSA)	*
Extrato de levedura	3g
Pirazina carboxamida	1g
Tampão tris maleato 0,2M pH 6,0	1 litro
121ºC/15min	

* Quantidade necessária para preparar 1 litro, conforme orientação do fabricante do meio.

Preparação. Suspender os ingredientes no tampão tris maleato e aquecer atá a fusão do agar. Disribuir em tubos (5ml/tubo), esterilizar a 121ºC/15min e inclinar com rampa longa.

Equivalentes comerciais

Completo não disponível

ÁGAR (CALDO) PÚRPURA BASE PARA CARBOIDRATOS

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de fermentação de carboidratos.

Composição do caldo base

Proteose peptona	10g
Extrato de carne	1g
Cloreto de sodio (NaCl)	5g
Púrpura de bromocresol (2ml da solução 1%)	0,02g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação do caldo. Dissolver os ingredientes da base, ajustar o pH em 6,8, distribuir em tubos de 10x100mm com tubinhos de Durhan (4ml/tubo) e esterilizar a 121°C/15min. Separadamente, preparar uma solução 10% do carboidrato a ser testado e esterilizar por filtração. Adicionar assepticamente aos tubos de meio base a quantidade de solução necessária para atingir a concentração final desejada (para concentração final de 0,5%, adicionar 0,2ml de solução/4ml de base). **Preparação do ágar.** Preparar o caldo base suplementado com 15g/l de ágar e esterilizar a 121°C/15min, em porções de 100ml. Resfriar a 50-5°C e adicionar assepticamente, a cada 100ml de base, 10ml da solução de carboidrato, para concentração final 1%, ou 5ml, para concentração final 0,5%. Plaquear imediatamente ou distribuir assepticamente em tubos de 10x100mm estéreis (5ml/tubo), inclinando de forma a obter fundo com no mínimo 2,5cm. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 0,1g em 2ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Purple Agar Base (DIFCO 222810)
Purple Broth Base (BBL 211558)

ÁGAR R2A

Aplicação. Meio para contagem de bactérias heterotróficas em água.

Composição

Extrato de levedura	0,5g
Proteose peptona Nº 3 ou polipeptona	0,5g
Casamino acids	0,5g
Glicose	0,5g
Amido solúvel	0,5g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	0,3g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)	0,05g
Piruvato de sódio	0,3g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121°C/15min	

Preparação. Misturar os ingredientes e ajustar o pH em 7,2±0,2, adicionando K_2HPO_4 ou KH_2PO_4. Aquecer até fusão do ágar, esterilizar em autoclave a 121ºC/15min e distribuir em placas ou usar imediatamente, não deve ser reaquecido.

Equivalentes comerciais

R2A Agar (ACUMEDIA 7390)
R2A Agar (DIFCO 218263)
R2A Agar MERCK 1.00416)
R2A Agar (OXOID CM 906)

ÁGAR ROGOSA SL

Aplicação. Meio seletivo para contagem de bactérias láticas.

Composição

Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
Dextrose	10g
Arabinose	5g
Sacarose	5g
Acetato de sódio	15g
Citrato de amônia	2g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	6g
Sulfato de magnésio	0,57g
Sulfato de manganês	0,12g
Sulfato ferroso	0,03g
Sorbitano monooleato	1g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 5,4±0,2 - fervura	

Preparação. Dissolver os ingredientes e ferver até a completa fusão do ágar. Adicionar 1,32ml de ácido acético glacial para cada litro de meio e continuar a fervura por mais 2-3 minutos. Não autoclavar. Utilizar imediatamente, o meio acidificado não pode ser reaquecido. O pH final deve ser 5,4.

Equivalentes comerciais

Rogosa SL Agar (DIFCO 248020)
Rogosa SL Broth (DIFCO 247810)
Rogosa Agar (OXOID CM 627)
Rogosa Agar (MERCK 1.05413)

ÁGAR SANGUE Nº 2

Aplicação. Ágar sangue para verificação de hemólise, utilizado na confirmação de L. monocytogenes.

Composição da base

Proteose peptona	15g
Fígado digerido	2,5g
Extrato de levedura	5g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Ágar	12g
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Suplemento

Sangue de carneiro desfibrinado	5ml/100ml base

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar a 45-50ºC e adicionar, para cada 100ml de base, 5ml de sangue de carneiro desfibrinado. Plaquear imediatamente.

Equivalentes comerciais da base

Blood Agar Base Nº 2 (DIFCO 269620)
Blood Agar Base Nº 2 (OXOID CM 271)
Blood Agar Base Nº 2 (ACUMEDIA 7266)
Blood Ágar Base (Infusion Ágar) (BBL 211037)

Equivalentes comerciais sangue carneiro desfibrinado

Sangue carneiro desfibrinado (LABORCLIN 520209, 521521 ou 520246) (frasco com 15, 20 ou 100ml)

HL
ÁGAR SANGUE DE CAVALO EM SOBRECAMADA

Aplicação. Ágar sangue para verificação de hemólise, utilizado na confirmação de L.monocytogenes pelo método do United States Department of Agriculture (USDA), descrito no Capítulo 8.04 do Microbiology Laboratory Guidebook (MLG/FSIS, 2005).

Composição

Ágar Columbia (Base)	1 litro
Sangue de cavalo	4%

Preparação. Preparar a base, esterilizar a 121ºC/15min e distribuir em placas. Reservar uma porção da base, para a preparação da sobrecamada. A essa porção reservada (fundida e resfriada a 46ºC), adicionar 4% de sangue de cavalo e distribuir 5-6ml sobre as placas da base previamente preparadas, em sobrecamada. O pH final deve ser 7,2±0,2. Estocar as lacas em geladeira por até 2 semanas.

Equivalentes comerciais da base

Columbia Agar Base (BBL 211124)
Columbia Agar Base (MERCK 1.10455)
Columbia Blood Agar Base (ACUMEDIA 7125)
Columbia Blood Agar Base (DIFCO 279240)
Columbia Blood Agar Base (OXOID CM 331)

ÁGAR SELO

Aplicação. Ágar para selar tubos de cultura de microrganismos anaeróbios.

Composição

Ágar	2g
Água destilada	100ml
121ºC/15min	

ÁGAR SELO TIOGLICOLATO

Aplicação. Usado para selar tubos de cultura na análise de esporos de mesófilos anaeróbios em leite fluído e queijos, segundo o método do NMP descrito no item 8.100 do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wehr & Frank, 2004).

Composição

Ágar	2g
Tioglicolato de sódio	0,1g
Água destilada	100ml
120±1ºC/15min	

OSA/OSB
ÁGAR (CALDO) SORO DE LARANJA

Aplicação. Meio para isolamento e contagem de bactérias láticas ou microrganismos aeróbios totais em frutas cítricas e derivados.

Composição

Peptona de caseína	10g
Extrato de levedura	3g
Soro de laranja	10g
Glicose	4g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	2,5g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 5,5±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Plaquear imediatamente, o meio não deve ser reaquecido. Para preparar o caldo, omitir o ágar.

Equivalentes comerciais do ágar

Orange Serum Agar (ACUMEDIA 7587)
Orange Serum Agar (BBL 211486)

Orange Serum Agar (MERCK 1.10673)
Orange Serum Agar (OXOID CM 657)
Orange Serum Broth 10x concentrado (DIFCO 251810)

SIM
ÁGAR SULFETO INDOL MOTILIDADE

Aplicação. Meio para provas bioquímicas, testes de motilidade, indol e produção de H_2S.

Composição

Peptona de caseína	20g
Peptona de carne	6,1g
Sulfato ferroso amoniacal	0,2g
Tiossulfato de sódio	0,2g
Ágar	3,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,3 ±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, aquecer até a completa fusão do ágar, distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min. Não inclinar.

Equivalentes comerciais

SIM Medium (MERCK 1.05470)
SIM Medium (OXOID CM 435)
SIM Medium (BBL 211578)
SIM Medium (ACUMEDIA 7221)
SIM Medium (LABORCLIN 910059) (meio pronto em tubos)

ÁGAR SULFITO

Aplicação. Meio para cultivo de bactérias anaeróbias, usado na detecção de esporos de bactérias anaeróbias termófilas produtoras de H_2S.

Composição (formulado no laboratório segundo o método AOAC 972.45)

Triptona	10g
Sulfito de sódio anidro (Na_2SO_3)	1g
Ágar	20g
Água destilada	1 litro
121°C/20min	

Preparação (formulado no laboratório segundo AOAC 972.45) (Horwitz & Latimer, 2005). Dissolver os ingredientes, aquecer até a completa fusão do ágar e distribuir em tubos de 20x180mm (15ml/tubo) contendo um prego de ferro no fundo (limpar o prego em ácido clorídrico e enxaguar bem em água, antes de usar). Não é necessário ajustar o pH. Esterilizar a 121ºC/20min. Alternativamente, no lugar do prego, pode ser utilizada uma solução aquosa 5% de citrato férrico, adicionando-se 10ml da solução/litro de meio, antes da fusão do ágar, distribuição em tubos e

esterilização. As formulações dos equivalentes comerciais não são exatamente iguais e, para a preparação, deve ser seguida a orientação dos fabricantes. O meio da OXOID (CM 79) já contém citrato férrico, não exigindo a presença do prego. Os meios da DIFCO (297210) e MERCK (1.10864) não contém ferro.

Equivalentes comerciais

Iron Sulfite Agar (OXOID CM 79) (já contem citrato férrico)
Sulfite Agar (DIFCO 297210) (não contem citrato férrico)
Sulfite Iron Agar (MERCK 1.10864) (não contem citrato férrico)

ÁGAR (CALDO) T_1N_1

Aplicação. Meio para manutenção de *V.cholerae*.

Composição

Tripticase (hidrolizado de caseína, digestão pancreática)	10g
Cloreto de sódio (NaCl)	10g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e ferver até a completa fusão do ágar. Distribuir em tubos, esterilizar a 121ºC/15min e inclinar. Para a preparação do caldo, omitir o agar.

Equivalentes comerciais

Não disponível

Modificações

T_1N_0, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8 e T_1N_{10}. Para formular o meio com 0, 3, 6, 8 ou 10% de NaCl, adicionar o sal nas quantidades requeridas, ou seja, zero, 30, 60, 80 ou 100g, preparando da mesma forma.

TAA/TAB
ÁGAR (CALDO) THERMOACIDURANS

Aplicação. Meio para detecção de esporos de termófilos tipo "flat-sour", diferencial para isolamento de *Bacillus coagulans*. Usado também no teste de esterilidade comercial.

Composição do caldo

Proteose peptona	5g
Extrato de levedura	5g
Dextrose.	5g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	4g
Água destilada	1 litro
pH 5,0±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Para a preparação do ágar, adicionar 20g de ágar para cada litro de caldo.

Equivalentes comerciais do ágar

Thermoaciduran Agar (DIFCO 230310)

TCBS
ÁGAR TIOSSULFATO CITRATO BILE SACAROSE

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento de vibrios.

Composição

Polipeptona ou proteose peptona Nº 3	10g
Extrato de levedura	5g
Sacarose	20g
Tiossulfato de sódio.5H_2O	10g
Citrato de sódio.2H_2O	10g
Colato de sódio	3g
Bile de boi (Oxgall ou Oxbile)	5g
Cloreto de sódio (NaCl)	10g
Citrato férrico	1g
Azul de bromotimol (20ml da solução 0,2%)	0,04g
Azul de timol (4ml da solução 1%)	0,04g
Ágar	15g
Água destilada	completar para 1 litro
pH 8,6±0,2 - fervura	

Preparação. Suspender os ingredientes na água destilada, ajustar o pH em 8,6, ferver até a completa fusão do ágar e plaquear imediatamente. Não autoclavar. **Solução 0,2% de azul de bromotimol.** Dissolver 0,1g em 2,5ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada. **Solução 1% de azul de timol.** Dissolver 0,1g em 2ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Cholera Medium TCBS (OXOID CM 333)
TCBS Agar (ACUMEDIA 7210)
TCBS Agar (DIFCO 265020)
TCBS Agar (MERCK 1.10263)

ÁGAR TIROSINA

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de decomposição da tirosina para identificação de *Bacillus*, confirmação de *Bacillus cereus*.

Composição

Agar Nutriente (NA)	100ml
Suspensão aquosa 5% de L-Tirosina	10ml
121ºC/15min	

Preparação. Esterilizar separadamente o Ágar Nutriente e a suspensão de tirosina, a 121ºC/15min. Juntar assepticamente, distribuir em tubos estéreis de 10x100mm (4ml/tubo) e inclinar.

Equivalentes comerciais

Tirosina Agar (LABORCLIN 910400) (meio pronto em tubos)

TSI
ÁGAR TRÍPLICE AÇÚCAR FERRO

Aplicação. Meio para prova bioquímica, testes de fermentação da glicose, lactose e sacarose, teste de produção de H_2S.

Composição

Extrato de carne	3g
Extrato de levedura	3g
Peptona	15g
Proteose peptona	5g
Glicose	1g
Lactose	10g
Sacarose	10g
Sulfato ferroso ($FeSO_4$)	0,2g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$)	0,3g
Vermelho de fenol (12ml da solução 0,2%)	0,024g
Agar	12g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, fundir o ágar, distribuir em tubos de 10x100mm (4-5ml/tubo), esterilizar a 121ºC/15min e inclinar, mantendo fundo de no mínimo 2,5cm. **Solução 0,2% de vermelho de fenol.** Dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Triple Sugar Iron Agar (DIFCO 226540)
Triple Sugar Iron Agar (BBL 211749)
Triple Sugar Iron Agar (OXOID CM 277)
Triple Sugar Iron Agar (MERCK 1.03915)
Triple Sugar Iron Agar (ACUMEDIA 7162)

TSA/TSB
ÁGAR (CALDO) TRIPTICASE DE SOJA

Aplicação. Meio de enriquecimento e manutenção para uso geral.

Composição do caldo

Peptona de caseína	15g
Peptona de soja	3g
Cloreto de sódio	5g
Água destilada	1 litro
pH 7,3±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min.

Composição do ágar

Peptona de caseína	15g
Peptona de soja	3g
Cloreto de sódio	5g
Água destilada	1 litro
pH 7,3±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, fundir o ágar e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais do ágar

Trypticase Soy Agar (BBL 211043)
Tryptic Soy Agar (Acumedia 7100)
Tryptic Soy Agar (DIFCO 236950)
Tryptic Soy Agar (Caso Agar) (MERCK 1.05458)
Tryptone Soya Agar (OXOID CM 131)
TSA (Tryptic Soy Agar) (BIOCEN DO BRASIL 4004) (placas prontas)

Equivalentes comerciais do caldo com dextrose

Tryptone Soya Broth (OXOID CM 129)
Tryptic Soy Broth (Caso Broth) (MERCK 1.05459)
Tryptic Soy Broth (BACTO 211825)
Trypticase Soy Broth (BBL 211768)
Tryptic Soy Broth (Acumedia 7164)
Tryptic Soy Caldo (LABORCLIN 910040) (meio pronto em frascos com 225ml)

Equivalentes comerciais do caldo sem dextrose

Tryptic Soy Broth/without dextrose (BACTO 286220)

Modificações

Ágar (Caldo) Tripticase de Soja com 2-3% de NaCl. Usado na análise de *V. parahaemolyticus*, é preparado aumentando a concentração de sal para 20 a 30g/l, antes da esterilização do meio. O TSA já contém 5g/l de NaCl.

Caldo Tripticase de Soja com 10% de NaCl e 1% de piruvato de sódio. Usado na contagem de *S. aureus* pelo NMP, é preparado aumentando a concentração de sal para 100g/l e adicionando 10g/l de piruvato de sódio ao TSB, antes da esterilização do meio. O TSB já contém 5g/l de NaCl.

Caldo Tripticase de Soja com 20% de NaCl. Usado no teste de presença/ausência de *S. aureus*, é preparado aumentando a concentração de sal para 200g/l, antes da esterilização do meio. O TSB já contém 5g/l de NaCl.

Caldo Tripticase de Soja com polimixina. Usado na contagem de *B. cereus* pelo NMP, é preparado adicionando 10ml/l de uma solução 10.000IU/ml de sulfato de polimixina B ao TSB, depois da esterilização do meio. **Solução de sulfato de polimixina B 10.000IU/ml.** Dissolver 500.000 unidades do sulfato de polimixina em 50ml de água destilada, esterilizar por filtração e estocar sob refrigeração. Para determinar o peso de polimixina necessário para 500.000 unidades, verificar no frasco a potência da polimixina adquirida (varia entre as marcas e lotes). Por exemplo, se a potência for 7.900U/mg, significa que cada miligrama tem 7.900 unidades e que são necessárias 63,29mg para 500.000 unidades.

Caldo Tripticase de Soja com K_2SO_3. Usado na análise de *Salmonella* para amostras de condimentos, é preparado adicionando 5g/l de sulfito de potássio (K_2SO_3) ao TSB, antes da esterilização do meio.

Caldo Tripticase de Soja com sulfato ferroso. Usado na análise de *Salmonella* para amostras de ovos, é preparado adicionando 35mg/l de sulfato ferroso ao TSB, antes da esterilização do meio.

Ágar (Caldo) Tripticase de Soja Extrato de Levedura (TSA-YE, TSB-YE). Usado na análise de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, é preparado adicionando 6g/l (0,6%) de extrato de levedura ao meio, antes da esterilização. **Equivalente comercial:** Trypitic Soy Agar YE (LABORCLIN 910015) (placas prontas).

Ágar Tripticase de Soja Sangue de Carneiro (TSA-SANGUE). Usado para verificação de hemólise na análise de *B. cereus*. Preparar porções de 100ml de Ágar Tripticase de Soja (TSA) e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar a 50ºC e adicionar assepticamente, a cada 100ml de meio, 5ml de sangue de carneiro desfibrinado, plaqueando imediatamente.

Caldo Tripticase de Soja (TSB) em concentração dupla. Usado no teste de presença/ausência de *S. aureus*, é preparado adicionado-se o dobro da quantidade dos ingredientes por litro de água.

TGE
ÁGAR TRIPTONA GLICOSE EXTRATO DE CARNE

Aplicação. Meio de enriquecimento para contagem total de microrganismos em placas ou para manutenção de culturas, também é utilizado para a contagem de esporos de bactérias aeróbias mesófilas.

Composição

Triptona	5g
Extrato de carne	3g
Glicose	1g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Preparar porções de 100ml, para a contagem de esporos em alimentos.

Equivalentes comerciais

Tryptone Glucose Extract Agar (DIFCO 223000)
Tryptone Glucose Extract Agar (OXOID CM 127)
Tryptone Glucose Extract Agar (MERCK 1.10128)
Tryptone Glucose Extract Agar (ACUMEDIA 7242)

TGYA - TGYB
ÁGAR (CALDO) TRIPTONA GLICOSE EXTRATO DE LEVEDURA 0,5% ÁCIDO ACÉTICO

Aplicação. Meio para isolamento ou contagem de leveduras resistentes aos conservantes, método Pitt & Hocking (2009).

Composição da base (Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura)

Glicose	100g
Triptona	5g
Extrato de levedura	5g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
121ºC/10min (não é necessário ajustar o pH)	

Suplemento

Ácido acético glacial	5ml por litro de base

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/10min (prolongamento da esterilização pode causar reação de Maillard). No momento do uso, fundir o ágar (se presente), resfriar a 45-50ºC e adicionar o ácido acético, que não precisa ser esterilizado (concentração final 0,5%). O meio sólido completo deve ser utilizado ou plaqueado imediatamente, não podendo ser reaquecido. O pH final é de 3,8.

Equivalentes comerciais

Não disponível

TSC
ÁGAR TRIPTOSE SULFITO CICLOSERINA

Aplicação. Meio seletivo/diferencial para isolamento de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens.*

Composição da base

Triptose	15g
Peptona de soja	5g
Extrato de levedura	5g
Metabissulfito de sódio	1g
Citrato férrico amoniacal	1g
Agar	20g
Água destilada	1 litro
pH 7,6±0,2 - 121ºC/15min	

Suplemento

Solucão 4% de D-Cicloserina	10ml/l base
Suspensão gema de ovo:salina (1:1) (opcional)	80ml/l base

Preparação. Esterilizar a base a 121ºC/15min, resfriar a 45-50ºC, adicionar assepticamente a solução de cicloserina préviamente preparada e plaquear imediatamente. Para a preparação do TSC com gema de ovo, adicionar também a suspensão de gema de ovo/salina, antes do plaqueamento. **Solução aquosa de D-cicloserina 4%.** Esterilizar por filtração. **Emulsão de gema de ovo.** Mergulhar os ovos em etanol 70% por 10 minutos, flambar, abrir assepticamente e tranferir as gemas para um frasco estéril tarado. Adicionar às gemas uma quantidade de solução salina 0,85% estéril, suficiente para diluição 1:1. Misturar o conteúdo por agitação ou com o auxílio de baguetas estéreis, até obter uma suspensão homogênea.

Equivalentes comerciais da base

Shahidi Ferguson Perfringens (SFP) Agar Base (DIFCO 281110)
Perfringens Agar Base (OXOID CM 587)
TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) Agar Base (MERCK 1.11972)

Equivalentes comerciais dos suplementos

Perfringens TSC Selective Supplement (OXOID SR 88)
D-Cycloserine (MERCK 1.08097)
Egg Yolk Emulsion (MERCK 1.03784)
Egg Yolk Emulsion (OXOID SR 47)
Egg Yolk Enrichment 50% (DIFCO 233472)
Egg Yolk s/Telurito (LABORCLIN 520088)

Equivalentes comerciais do meio completo (placas prontas)

TSC Agar (LABORCLIN 910036)

ÁGAR (CALDO) URÉIA DE CHRISTENSEN

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de urease.

Composição do caldo

Peptona	1g
Glicose	1g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	2g
Uréia	20g
Vermelho de fenol (6ml de solução 0,2%)	0,012g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - filtração	

Preparação do caldo. Dissolver os ingredientes em um litro de água destilada, ajustar o pH e esterilizar por filtração. Não autoclavar. Distribuir assepticamente em tubos de 10x100mm previamente esterilizados (4ml/tubo).
Preparação do ágar a partir do caldo com uréia. Se o meio adquirido já tiver a uréia, não deve conter o ágar. Nesse caso, dissolver os ingredientes do caldo em 100ml de água destilada e esterilizar por filtração. Separadamente, preparar 900ml de ágar 1,5% e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar o ágar a 50-55ºC e juntar aos 100ml de caldo estéril. Distribuir assepticamente em tubos de 10x100mm previamente esterilizados (4ml/tubo) e inclinar com rampa longa e fundo curto.
Preparação do ágar a partir do meio sem uréia (base). Se o meio adquirido contiver ágar não deve conter uréia. Nesse caso, preparar uma solução aquosa de uréia a 40% e esterilizar por filtração. Separadamente, preparar esterilizar a base com ágar e os demais ingredientes. Resfriar a base a 45-50ºC e adicionar, para cada litro, 50ml da solução de uréia. Distribuir assepticamente em tubos de 10x100mm previamente esterilizados (4ml/tubo) e inclinar com rampa longa e fundo curto.
Solução 0,2% de vermelho de fenol. Dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Urea Agar Base (ACUMEDIA 7226) (com uréia sem ágar)
Urea Agar Base (BBL 211795) (caldo com uréia sem ágar)
Urea Agar Base (MERCK 1.08492) (com ágar sem uréia)
Urea Agar Base (OXOID CM 53) (com ágar sem uréia)
Urea Broth Base (OXOID CM 71) (sem uréia e sem ágar)

Modificações

Caldo Uréia de Christensen com 2-3% de NaCl. Usado na analise de *V. parahaemolyticus*, é preparado aumentado a concentração de sal para 20-30g/l. O meio já contém 5g/l de NaCl.

BGS
ÁGAR VERDE BRILHANTE SULFA

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento de *Salmonella*, recomendado no método do MLG/FSIS.

Composição

Extrato de levedura	3g
Polipeptona	10g
NaCl	5g
Lactose	10g
Sacarose	10g
Vermelho de fenol	0,08g
Verde brilhante	0,0125g
Sulfapiridina	1g
Ágar	20g
Água destilada	1 litro
ph 6,9± 0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Suspender os ingredientes na água destilada, ajustar o pH, aquecer até a completa fusão do ágar e esterilizar a 121ºC/15min. Plaquear imediatamente, o meio não deve ser reaquecido.

Equivalentes comerciais

BG Sulfa Agar (Difco 271710)

ÁGAR (CALDO) VERMELHO DE FENOL-CARBOIDRATOS

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de fermentação de carboidratos.

Composição do caldo base

Proteose peptona	10g
Extrato de carne (opcional)	1g
NaCl	5g
Vermelho de fenol (9ml da solução 0,2%)	0,018g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação do caldo. Dissolver os ingredientes da base, acertar o pH em 7,4, distribuir em tubos de 10x100mm (4ml/tubo) com tubinhos de Durhan e esterilizar a 121ºC/15 minutos. Preparar e esterilizar por filtração uma solução aquosa a 10% do carboidrato a ser testado e adicionar assépticamente aos tubos de meio base, na quantidade necessária para atingir a concentração final de 0,5 ou 1% no meio completo (0,4ml ou 0,2ml de solução de carboidrato/4ml de base).
Preparação do ágar. Preparar o caldo base suplementado com 15g/l de ágar e esterilizar a 121ºC/15min, em porções de 100ml. Resfriar a 50-55ºC e adicionar assépticamente, a cada 100ml de base, 10ml da solução de carboidrato, para concentração final 1%, ou 5ml, para concentração

final 0,5%. Plaquear imediatamente ou distribuir assépticamente em tubos de 10x100mm estéreis (5ml/tubo), inclinando de forma a obter fundo com no mínimo 2,5cm. **Solução 0,2% de vermelho de fenol.** Dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais do caldo base

Phenol Red Broth Base (ACUMEDIA 7148)
Phenol Red Broth Base (BBL 211506)
Phenol Red Broth Base (MERCK 1.10987)

VRBG
ÁGAR VERMELHO VIOLETA BILE COM GLICOSE

Aplicação. Meio seletivo/diferencial para contagem de enterobactérias.

Composição

Extrato de levedura	3g
Peptona	7g
Cloreto de sódio	5g
Sais biliares Nº 3	1,5g
Glicose	10g
Vermelho neutro (3ml da solução 1%)	0,03g
Cristal violeta (2ml da solução aquosa 0,1%)	0,002g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - fervura	

Preparação. Dissolver os ingredientes, aquecer até a completa fusão do ágar e plaquear imediatamente. Não autoclavar.

Equivalentes comerciais

Violet Red Bile Glucose Agar (DIFCO 218661)
Violet Red Bile Glucose Agar (ACUMEDIA 7425)
Violet Red Bile Glucose Agar (OXOID CM 485)
VRBD (Violet Red Bile Dextrose Agar) (MERCK 1.10275)
VRBDA (Violet Red Bile Dextrose Agar) (BIOCEN DO BRASIL 4039) (placas prontas)
VRBG (LABORCLIN 540163) (placas prontas)

VRB
ÁGAR VERMELHO VIOLETA BILE COM LACTOSE

Aplicação. Meio seletivo/diferencial para contagem de coliformes totais por plaqueamento direto.

Composição

Extrato de levedura	3g
Peptona	7g
Cloreto de sódio	5g
Sais biliares Nº 3	1,5g
Lactose	10g
Vermelho neutro (3ml da solução 1%)	0,03g
Cristal violeta (2ml da solução aquosa 0,1%)	0,002g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - fervura	

Preparação. Dissolver os ingredientes, aquecer até a completa fusão do ágar e plaquear imediatamente. Não autoclavar. **Solução de vermelho neutro.** Dissolver 1g em 100ml de solvente composto de 90% de etanol e 10% de água destilada.

Equivalentes comerciais

Violet Red Bile Agar (DIFCO 211695)
Violet Red Bile Lactose Agar (OXOID CM 107)
Violet Red Bile Agar (MERCK 1.01406)
Violet Red Bile Agar (ACUMEDIA 7165)

XLD
ÁGAR XILOSE LISINA DESOXICOLATO

Aplicação. Meio seletivo diferencial para isolamento presuntivo de *Salmonella*.

Composição

Extrato de levedura	3g
L-Lisina	5g
Xilose	3,75g
Lactose	7,5g
Sacarose	7,5g
Desoxicolato de sódio	2,5g
Citrato férrico amoniacal	0,8g
Tissulfato de sódio	6,8g
Cloreto de sódio	5g
Vermelho de fenol (40ml da solução 0,2%)	0,08g
Agar	15g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - fervura	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e ferver em banho-maria, sob constante agitação, até a completa fusão do ágar. Não autoclavar. Plaquear imediatamente, não pode ser reaquecido. **Solução 0,2% de vermelho de fenol.** Dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

XLD Agar (ACUMEDIA 7166)
XLD Agar (BBL 211838)
XLD Agar (DIFCO 278850)
XLD Agar (MERCK 1.05287)
XLD Agar (OXOID CM 469)
XLD Agar (LABORCLIN 540103) (placas prontas)

XLT4
ÁGAR XILOSE LISINA TERGITOL 4

Aplicação. Meio seletivo diferencial recomendado pelo MLG/FSIS para isolamento presuntivo de *Salmonella*.

Composição da base

Proteose peptona Nº 3	1,6g
Extrato de levedura	3g
L-Lisina	5g
Xilose	3,75g
Lactose	7,5g
Sacarose	7,5g
Citrato férrico amoniacal	0,8g
Tissulfato de sódio	6,8g
Cloreto de sódio	5g
Vermelho de fenol	0,08g
Agar	18g
Niaproof 4 (Tergitol 4)	4,6ml
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 – aquecer em banho-maria até a fervura	

Preparação. Suspender os ingredientes, ajustar o pH e ferver em banho-maria, sob constante agitação, até a completa fusão do ágar. Não autoclavar. Plaquear imediatamente, o meio fundido não deve ser mantido mais de 45 minutos antes do plaqueamento para evitar precipitação e não pode ser reaquecido.

Equivalentes comerciais do meio (sem tergitol 4)

XLT4 Agar (ACUMEDIA 7517)
XLT4 Agar Base (DIFCO 223420)
XLT4 Agar Base (MERCK 1.13919)

Equivalentes comerciais do Tergitol 4

XLT4 Agar Supplement (DIFCO 235310)
XLT4 Agar Supplement (Merck 1.08981)

Equivalentes comerciais do meio completo (placas prontas)

XLT4 (LABORCLIN 910078)

ÁGAR WAGATSUMA

Aplicação. Meio para teste de patogenicidade de *V.parahaemolyticus* (reação de Kanagawa).

Composição

Peptona	10g
Extrato de levedura	3g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	5g
NaCl	70g
Manitol	10g
Cristal violeta (1ml da solução aquosa 0,1%)	0,001g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 8,0±0,2 - fervura	

Preparação. Dissolver os ingredientes, exceto o ágar, e ajustar o pH em 8,0. Adicionar o ágar e aquecer apenas o tempo necessário para a completa fusão. Não autoclavar. Separadamente, lavar uma amostra de eritrócitos humanos ou de coelho por três vezes em salina fisiológica (0,85%) e reconstituir para o volume de sangue original. Adicionar 2ml dos eritrócitos lavados a cada 100ml do meio resfriado a 50ºC e plaquear imediatamente.

Equivalentes comerciais
Não disponível

H_2Op
ÁGUA PEPTONADA 0,1%

Aplicação. Diluente para homogeneização e diluição de amostras para a análise.

Composição

Peptona	1g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver a peptona na água destilada e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade requerida. Esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais
Água Peptonada 0,1% (LABORCLIN 910046) (diluente pronto em frasco 225ml)
Agua Peptonada 0,1% (LABORCLIN 510150) (diluente pronto em tubos com 9ml)

APA
ÁGUA PEPTONADA ALCALINA

Aplicação. Meio para enriquecimento de *Vibrio* sp.

Composição

Peptona	10g
NaCl	10g
Água destilada	1 litro
pH 8,5±0,2 - 121ºC/10min	

Preparação. Dissolver os ingredientes na água destilada, ajustar o pH e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade requerida. Esterilizar a 121ºC/10min.

BPW
ÁGUA PEPTONADA TAMPONADA

Aplicação. Diluente e meio de pré-enriquecimento para detecção de *Salmonella*.

Composição

Peptona	10g
NaCl	5g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	3,5g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade reqerida. Esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Buffered Peptone Water (ACUMEDIA 7418)
Buffered Peptone Water (BBL 212367)
Buffered Peptone Water (DIFCO 218105)
Buffered Peptone Water (OXOID CM 509)
Peptone Water Buffered (MERCK 1.07228)
Água Peptonada Tamponada (LABORCLIN 900047) (meio pronto em frasco com 225ml)

Modificações

Água Peptonada Tamponada com cristal violeta. Usada para a análise de *Salmonella* em produtos fermentados, método MLG/FSIS (2004). Para preparar, adicionar 1ml da solução aquosa 1% de cristal violeta para cada litro de BPW, ajustar o pH em 7,2±0,2 esterilizar da maneira normal.

H_2Osp
ÁGUA SALINA PEPTONADA

Aplicação. Diluente para homogeneização e diluição de amostras para a análise.

Composição

NaCl	8,5g
Peptona	1g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade reqerida. Esterilizar a 121ºC/15min.

H_2Ovb
ÁGUA VERDE BRILHANTE

Aplicação. Diluente para pré-enriquecimento de amostras de leite na análise de *Salmonella*.

Composição

Solução aquosa de verde brilhante a 1%	2ml
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade requerida. Esterilizar a 121ºC/15min.

CA
CALDO ÁCIDO
(vide Caldo Thermoacidurans, mesma formulação)

CALDO ALI
vide Ágar (Caldo) ALI

CALDO APT
vide Ágar (Caldo) All Purpose Tween

CALDO ASPARAGINA

Aplicação: meio para determinação de *Pseudomonas aeruginosa* em água pela técnica dos tubos múltiplos, teste presuntivo.

Composição

Asparagina (DL)	3g
Fosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4)	1g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)	0,5g
Água destilada	1 litro
pH 6,9-7,2 121ºC/15min	

Preparação: Para a análise de 10 porções de 10ml da amostra, preparar o caldo em concentração dupla. Para a analise de diluições, preparar em concentração simples. Dissolver os ingredientes com aquecimento, sem ferver, resfriar e ajustar o pH. Distribuir o meio em concentração dupla em tubos de 18x180mm (10ml/tubo) e o meio em concentração simples em tubos de 16x150mm (10ml/tubo). Esterilizar em autoclave (121°C/15min).

Equivalentes comerciais

Não disponível

CALDO BOLTON

Aplicação. Meio de enriquecimento para *Campylobacter*.

Composição da base

Peptona de carne (digestão enzimática)	10g
Hidrolizado de lactoalbumina	5g
Extrato de levedura	5g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Piruvato de sódio	0,5g
Metabissulfito de sódio	0,5g
Carbonato de sódio	0,6g
Ácido alfa cetoglutárico	1g
Heme (dissolvido em hidróxido de sódio 0,1%)	0,01g
Água destilada	1 litro
7,4±0,2 - 121°C/15min	

Solução de antibióticos

Cefoperazona	20mg
Vancomicina	20mg
Lactato de trimetroprima	20mg
Anfotericina B	10mg
Mistura 50/50 água destilada/etanol estéril	5ml

Meio completo

Base	1 litro
Sangue de cavalo lisado desfibrinado*	50ml
Solução de antibióticos	5ml

* Usar sangue de cavalo lisado com saponina ou lisado por congelamento e descongelamento.

Preparação. Dissolver os ingredientes da base, aquecendo se necessário. Ajustar o pH em 7,4±0,2 e esterilizar a 121°C/15min. Separadamente, dissolver os antibióticos na mistura 50/50 água destilada/etanol esterilizada por filtração. Resfriar a base à 47-50°C, adicionar o sangue de cavalo e depois os antibióticos. Estocar protegido da luz, a 3±2°C, por não mais de sete dias. No dia do uso, não pode ser mantido à temperatura ambiente por mais de quatro horas.

Equivalentes comerciais da base

Bolton Selective Enrichment Broth Base (MERCK 1.00068)
Bolton Broth (OXOID CM 983)

Equivalentes comerciais dos suplementos

Bolton Broth Selective Supplement (MERCK 1.00079)
Modified Bolton Broth Selective Supplement (OXOID SR 208)

CALDO *BRUCELLA*

Aplicação. Meio para cultivo de bactérias fastidiosas, utilizado como base para a formulação de diversos meios seletivos e diferenciais. Aplicado na análise de *Campylobacter*.

Composição

Peptona de caseína (digestão enzimática)	10g
Peptona de carne (digestão enzimática)	10g
Extrato de levedura	2g
Glicose	1g
NaCl	5g
Bissulfito de sódio	0,1g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Equivalentes comerciais

Brucella Broth (ACUMEDIA 7121)
Brucella Broth (BBL 211088)

KCN
CALDO CIANETO DE POTÁSSIO
(CUIDADO, VENENO)

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de crescimento em presença de cianeto de potássio.

Composição da base

Polipeptona ou proteose peptona Nº 3	3g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Fosfato monopotássico (KH_2O_4)	0,225g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	5,64g
Água destilada	1 litro
pH 7,6±0,2 - 121ºC/15min	

Suplemento

Solução aquosa de cianeto de potássio (KCN) a 0,5%	15ml/litro base

Preparação. Dissolver os ingredientes da base, ajustar o pH em 7,6±0,2 e esterilizar a 121°C/15min. Manter sob refrigeração até o momento do uso. Preparar a solução aquosa 0,5% de KCN e manter também sob refrigeração. Para preparar o meio completo, adicionar 15ml da solução de KCN a cada litro da base. Distribuir o meio completo em tubos estéreis de 13x100mm (1,0 a 1,5ml/tubo). Usar tubos com tampas de rolha, parafinando as rolhas da seguinte forma: ferver as rolhas em parafina por cinco minutos e selar então os tubos, de forma que a parafina não escorra para o meio de cultura, mas sim, forme um selo entre a rolha e a boca do tubo. Estocar os tubos sob refrigeração (5-8°C) por não mais de duas semanas.
Cuidado, o KCN é venenoso. Trabalhar com luvas e máscara, sobre bandejas, não diretamente sobre a bancada, não pipetar com a boca, mas sim, com pipetador.

CALDO CITRATO DE KOSER

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de citrato.

Composição

Fosfato de sódio amoniacal ($NaNH_5PO_4$)	1,5g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1g
Sulfato de magnésio	0,2g
Citrato de sódio	3g
Água destilada	1 litro
pH 6,7±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, acertar o pH em 6,7, distribuir em tubos de 10x100mm (3-4ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Koser Citrate Medium (DIFCO 215100)
Koser Citrate Medium (OXOID CM 65)

CALDO DESCARBOXILASE

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de arginina dehidrolase ou lisina/ornitina descarboxilase, utilizado na confirmação de *Salmonella*, método ISO 6579 (2002) e *Enterobacter sakazakii* (ISO/TS 22964 (2006).

Composição

Aminoácido*	5g
Extrato de levedura	3g
Glicose	1g
Púrpura de bromocresol (1,5ml da solução 1%)	0,015g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121°C/15min	

* Cloridrato de L-Lisina (Lisina-HCl), L-ornitina (Ornitina-HCl) ou L-arginina (Arginina-HCl).

Preparação. Dissolver os ingredientes, acertar o pH em 6,8 e distribuir em tubos de 10x100mm com tampa de rosca (4-5ml/tubo). Esterilizar a 121ºC/15min. **Solução 1% de púrpura de**

bromocresol. Dissolver 0,1g em 2ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Não há equivalentes comerciais com a exata composição do meio descrito pela ISO 6579 e 22964. O caldo Descarboxilase de Falkow (Lysine Decarboxilase Broth Difco 211759) é muito próximo, com as seguintes diferenças: contém 0,02g de púrpura de bromocresol e 5g de peptona.

CALDO DESCARBOXILASE DE FALKOW

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de lisina descarboxilase.

Composição da base

Aminoácido*	5g
Peptona	5g
Extrato de levedura	3g
Glicose	1g
Púrpura de bromocresol (2ml da solução 1%)	0,02g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

* Cloridrato de L-Lisina (Lisina-HCl), L-ornitina (Ornitina-HCl) ou L-arginina (Arginina-HCl).

Preparação. Aquecer os ingredientes até a dissolução. Distribuir em tubos (5ml/tubo) e esterilizar a 121°C/15min. Apertar bem as tampas para a estocagem, o pH final deve ser 6.8 ± 0.2. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 0,1g em 2ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Decarboxylase Medium Base (DIFCO 287220) (base sem aminoácido)
Lysine Decarboxylase Broth (DIFCO 211759) (mesma base com lisina adicionada)

CALDO DESCARBOXILASE DE MOELLER

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de descarboxilação de aminoácidos (arginina dehidrolase ou lisina/ornitina descarboxilase).

Composição da base

Aminoácido*	5g
Peptona	5g
Extrato de carne	5g
Dextrose	0,5g
Púrpura de bromocresol (1ml da solução 1%)	0,01g
Vermelho de cresol (2,5ml da solução 0,2%)	0,005g
Piridoxal	0,005g
Água destilada	1 litro
pH 6,0±0,2 - 121º/10min	

* Cloridrato de L-Lisina (Lisina-HCl), L-ornitina (Ornitina-HCl) ou L-arginina (Arginina-HCl).

Preparação. Dissolver os ingredientes do meio base, adicionar 1% do L-aminoácido (2% no caso de usar uma mistura dos isômeros DL), acertar o pH em 6,0+0,2, distribuir em tubos de 10x100mm (4-5ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/10min. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 0,1g em 1,9ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada. **Solução 0,2.% de vermelho de cresol.** Dissolver 0,1g em 2,6ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Decarboxylase Base Moeller (DIFCO 289020)
Moeller Decarboxylase Broth Base (BBL 211430)

BCP
CALDO DEXTROSE PÚRPURA DE BROMOCRESOL

Aplicação. Meio para cultivo de bactérias aeróbias e verificação da produção de ácido durante o crescimento. Utilizado no teste de esterilidade comercial e teste de diagnóstico da causa de deterioração de alimentos de baixa acidez comercialmente estéreis.

Composição

Dextrose	10g
Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Púrpura de bromocresol (3,2ml da solução 1%)	0,032g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e distribuir em tubos de 20x180mm (15ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15 minutos. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 0,1g em 1,9ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Não disponível

DTB
CALDO DEXTROSE TRIPTONA
(vide Ágar Dextrose Triptona)

DRCM
CALDO DIFERENCIAL REFORÇADO PARA CLOSTRÍDIOS

Aplicação: meio diferencial para contagem de clostrídios sulfito redutores em água pelo método dos tubos múltiplos ISO 6461-1:1986.

Composição da base

Peptona de carne (digestão tríptica)	10g
Extrato de carne	10g
Acetato de sódio	5g
Extrato de levedura	1,5g
Amido solúvel	1g
Glicose	1g
Cloridrato de L-cisteína	0,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,1-7,2 - 121ºC/15min	

Suplemento estéril

Solução de citrato férrico ($C_6H_5O_7Fe$) (7%) e sulfito de sódio (Na_2SO_3) (4%)	0,2ml/tubo com 10ml

Preparação: Para a análise de 10 porções de 10ml da amostra, preparar o caldo em concentração dupla. Para a analise de diluições, preparar em concentração simples. Dissolver o amido em 200ml de água e aquecer com agitação até gelatinizar. Dissolver os demais ingredientes em 800ml de água, aquecer sem atingir fervura e juntar ao amido. Resfriar, ajustar o pH e distribuir em tubos de 18x180mm (10ml do caldo concentração dupla) ou 16x150mm (10ml do caldo em concentração simples). Esterilizar a 121ºC/15min e, no momento do uso, adicionar a cada tubo com 10ml da base em concentração simples, 0,2ml da solução de citrato férrico e sulfito de sódio. Para o caldo em concentração dupla, adicionar 0,4ml para cada 10ml da base. **Solução de citrato férrico (7%) e sulfito de sódio (4%):** Preparar uma solução aquosa de sulfito de sódio a 4% e uma solução aquosa de citrato férrico a 7% (aquecendo para dissolver). Juntar essas duas soluções na proporção 1:1 em volume. Esterilizar por filtração e estocar em geladeira por até 14 dias.

Equivalentes comerciais

Differential Reinforced Clostridial Broth (DRCM) (MERCK 1.11699)

EC
CALDO *E.COLI*

Aplicação. Meio para contagem de coliformes fecais, confirmação de resultado presuntivo pelo método do NMP.

Composição

Triptose	20g
Lactose	5g
Sais biliares Nº 3	1,5g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	4g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,5g
Cloreto de sódio	5g
Água destilada	1 litro
pH 6,9±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, acertar o pH, distribuir em tubos de 16x150mm com tubo de Durhan (aproximadamente 6ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

EC Medium (DIFCO 231430)
EC Broth (MERCK 1.10765)
EC Medium (ACUMEDIA 7206)
EC Broth (OXOID CM 0853)

EC-MUG
CALDO *E.COLI* COM 4-METILUMBELIFERIL-β-D-GLICURONÍDEO

Aplicação. Meio seletivo/diferencial para confirmação de *E.coli.*

Composição

Caldo *E.coli* (EC)	1 litro
4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo	50mg
pH 6,0+0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e distribuir em tubos com tubo de Durhan. Esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

EC Medium w/ MUG (DIFCO 222200)
EC Medium w/ MUG (Acumedia 7361)

EHEC-EB
CALDO DE ENRIQUECIMENTO PARA *E. COLI* ENTEROHEMORRÁGICA

Aplicação. Meio de enriquecimento seletivo para a detecção de *E. coli* O157:H7 em alimentos, método BAM/FDA.

Composição da base

Caldo Tripticase de Soja (TSB)	1 litro
Sais biliares Nº 3	1,5g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	1,5g
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Suplementos esterilizados por filtração

Cefixima	0,0125mg/litro base
Cefsulodina	10mg/litro base
Vancomicina	8mg/litro base

Preparação. Dissolver os ingredientes da base, ajustar o pH em 7,4±0,2 e esterilizar a121ºC/15min. Resfriar a 45-50ºC e adicionar os suplementos pré esterilizados por filtração.

Equivalentes comerciais

Modified Tryptone Soya Broth (Oxoid CM 989) (Base)
VCC Selective Supplement (Oxoid SR 0190)

EEB
CALDO DE ENRIQUECIMENTO DE *ENTEROBACTERIACEAE*

Aplicação. Meio seletivo para enriquecimento de enterobactérias, utilizado na contagem pelo método do NMP em alimentos.

Composição

Peptona	10g
Glicose	5g
K_2HPO_4	6,45g
KH_2PO_4	2g
Bile de boi	20g
Verde brilhante	0,0135g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, acertar o pH, distribuir em tubos ou frascos e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

EE Broth (Oxoid CM 317)
EE Broth Mossel (Merck 1.05394)

BLEB
CALDO DE ENRIQUECIMENTO PARA *LISTERIA* TAMPONADO

Aplicação. Meios de enriquecimento seletivo para *Listeria monocytogenes*, utilizado no método do BAM/FDA (Hitchins, 2003).

Composição da base

Caldo Tripticase de Soja (TSB)	1 litro
Extrato de levedura	6g
Fosfato monoptássico anidro (KH_2PO_4)	1,35g
Fosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)	9,6g
* Piruvato de sódio	1,1g
pH 7,3±0,2 - 121ºC/15min	

* Alguns equivalentes comerciais da base não contém piruvato de sódio.

Suplementos	Volume da solução em 225ml da base	Concentração final no meio completo
Acrifavina HCl - solução aquosa 0,5%	0,455ml	10mg/l
Ácido nalidíxico sal sódico - solução aquosa 0,5%	1,8ml	40mg/l
Cicloeximida - solução 1% preparada em uma mistura com 40% (v/v) de etanol em água	1,15ml	50mg/l
Esterilizar por filtração		

Preparação. Dissolver os ingredientes da base, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Separadamente preparar as soluções dos suplementos e esterilizar por filtração. Os suplementos devem ser adicionados durante o ensaio, após um período de quatro horas de incubação do caldo com a amostra a 30ºC.

Equivalentes comerciais da base

Buffered *Listeria* Enrichment Broth Base (DIFCO 290720)
Buffered *Listeria* Enrichment Broth Base (MERCK 1.09628)
Buffered *Listeria* Enrichment Broth (OXOID CM 897) (não contém piruvato de sódio)

MOPS-BLEB
CALDO DE ENRIQUECIMENTO DE *LISTERIA* TAMPONADO COM ÁCIDO MORFOLINOPROPANOSULFÔNICO

Aplicação. Meio de enriquecimento secundário de *Listeria monocytogenes*, método MLG/FSIS/USDA (2009).

Composição

Caldo Tripticase de Soja (TSB)	1 litro
Extrato de levedura	6g
Cicloeximida*	0,05g
Acriflavina HCL	0,015g
Ácido nalidíxico	0,04g
MOPS ácido livre**	6,7g
MOPS sal de sódio**	10,5g
pH 7,3±0,2 - 121ºC/15min	

*** Cuidado. O contato com os olhos pode causar irritação. O contato com a pele é irritante e a absorção através da pele é prejudicial e pode causar dermatite. A inalação pode provocar irritação das mucosas, com possíveis efeitos irreversíveis. A ingestão pode causar envenenamento letal (Fisher Scientific Safety Data Sheet, 2006).**
**** MOPS = 3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid.**

Preparação. Dissolver todos os ingredientes e esterilizar a 121ºC/15min.

EM
CALDO EXTRATO DE MALTE

Aplicação. Meio para isolamento de bolores e leveduras, usado no teste de esterilidade comercial.

Composição

Extrato de malte	6g
Dextrose	6g
Maltose	1,8g
Extrato de levedura	1,2g
Água destilada	1 litro
pH 4,7±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, distribuir em tubos de 20 x 180mm (10ml/tubo) e esterilizar a 121°C/15min.

Equivalentes comerciais

Malt Extract Broth (Difco 211320)

CALDO FRASER

Aplicação. Meio de enriquecimento seletivo diferencial para detecção de *L.monocytogenes.*

Composição da base

Proteose peptona	5g
Triptona	5g
Extrato de carne	5g
Extrato de levedura	5g
Cloreto de sódio (NaCl)	20g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,35g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	9,6g
Esculina	1g
Cloreto de lítio	3g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Suplementos estéreis

Ácido nalidíxico (4ml da solução aquosa 0,5%)	20mg/litro de base
Acriflavina HCl (5ml da solução aquosa 0,5%)	25mg/litro de base
Citrato férrico amoniacal (10ml da solução aquosa 5%)	0,5g/litro de base

Preparação. Preparar a base, ajustar o pH e esterilizar a 121ºC/15min. Preparar separadamente as seguintes soluções, esterilizadas por filtração: solução aquosa 0,5% do ácido nalidíxico, solução aquosa 0,5% da acriflavina HCl e solução aquosa 5% do citrato férrico amoniacal. Estocar em frasco escuro, sob refrigeração. No momento do uso, adicionar a cada litro de base, 4ml da solução de ácido nalidíxico, 5ml da solução de acriflavina HCl e 10ml da solução de citrato férrico.

Equivalentes comerciais da base

Fraser Broth Base (ACUMEDIA 7626)
Fraser Broth Base (ACUMEDIA 7502) (já contém acriflavina HCl e ácido nalidíxico)
Fraser Broth Base (DIFCO 211767) (já contém acriflavina HCl e ácido nalidíxico)
Fraser Broth (OXOID CM 895)
Fraser *Listeria* Selective Enrichment Broth Base (MERCK 1.10398)

Equivalentes comerciais dos suplementos

Fraser Broth Supplement (DIFCO 211742) (apenas citrato férrico amoniacal)
Fraser *Listeria* Supplement (MERCK 1.10399)
Fraser Supplement (OXOID SR 156)

Modificações

Caldo Half-Fraser. Usado no enriquecimento primário do método ISO 11290-1:1996. É preparado adicionando-se apenas a metade da concentração dos agentes seletivos Ácido nalidíxico (2ml da solução aquosa 0,5% por litro de base) e Acriflavina HCl (2,5ml da solução aquosa 0,5% por litro de base).

CF
CALDO DE FÍGADO

Aplicação. Meio para cultivo de bactérias anaeróbias em geral, utilizado no teste de esterilidade comercial, teste de detecção da causa de deterioração de enlatados de baixa acidez e teste de presença/ausência para *C. perfringens*.

Composição

Caldo de 500g de fígado cozido	1 litro
Peptona	10g
Amido solúvel	1g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	1g
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Moer 500g de fígado bovino cru e cozinhar uma hora sob fervura, em um litro de água destilada. Filtrar em duas camadas de gase, pressionando bem para recolher todo o caldo. Espalhar a carne em uma bandeja e secar por algumas horas em estufa de secagem, a aproximadamente 100ºC. Armazenar o caldo e a carne separadamente, sob congelamento. Para a preparação do meio completo, descongelar o caldo, suplementar com os ingredientes descritos na composição, ajustar o pH em 7,0 e distribuir em tubos de 20x180mm (15ml/tubo). Antes de distribuir o caldo nos tubos, adicionar a cada tubo, uma pequena quantidade da carne moída armazenada. Esterilizar a 121ºC/15min. **Observação.** Recomenda-se que seja utilizado o meio comercial, porque na formulação preparada em laboratório, o fígado bovino pode conter inibidores, incluindo antibióticos (Ashton & Bernard, 2001).

Equivalentes comerciais

Liver Broth (OXOID CM 77) (não tem amido)

BHI
CALDO INFUSÃO CÉREBRO CORAÇÃO
(vide Ágar Infusão Cérebro Coração)

VIB
CALDO INFUSÃO DE VITELA

Aplicação. Meio para preservação de cepas de *Y.enterocolitica* sob congelamento.

Composição

Infusão de 500g de vitela	10g
Proteose peptona Nº 3	10g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH em 7,4±0,2 e esterilizar a 121ºC/15min.
Equivalentes comerciais
Veal Infusion Broth (DIFCO 234420)

KFB
CALDO KF *STREPTOCOCCUS*

Aplicação. Meio seletivo para contagem de enterococos pelo método do NMP.

Composição da base

Proteose peptona	10g
Extrato de levedura	10g
NaCl	5g
Glicerofosfato de sódio	10g
Maltose	20g
Lactose	1g
Azida de sódio	0,4g
Púrpura de bromocresol (1,5ml da solução 1%)	0,015g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/10min	

Preparação. Suspender os ingredientes da base e aquecer até a completa dissolução. Distribuir em tubos (10ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/10min. **Solução 1% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 0,1g em 2ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 10ml com água destilada.

Equivalentes comerciais da base
KF Streptococcus Broth (DIFCO 212226)

CL
CALDO LACTOSADO

Aplicação. Meio de pré-enriquecimento para detecção de *Salmonella.*

Composição

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Lactose	5g
Água destilada	1 litro
pH 6,9±0,2 - 121ºC/15min	

Equivalentes comerciais

Lactose Broth (DIFCO 211835)
Lactose Broth (MERCK 1.07661)
Lactose Broth (BBL 211333)
Lactose Broth (OXOID CM 137)
Lactose Broth (ACUMEDIA 7141)

Modificações

Caldo Lactosado (CL) suplementado com solução de celulase 1%. Dissolver 1g de celulase em 99ml de água destilada estéril, esterilizar por filtração e estocar em geladeira (2-5°C) por até duas semanas. No momento da homogeneização da amostra, adicionar aos 225ml de Caldo Lactosado, 2,25ml da solução de celulase, seguindo com a homogeneização.

Caldo Lactosado (CL) suplementado com solução de papaína 5%. Adicionar 5g de papaína a 95ml de água destilada estéril e dissolver completamente. No momento da homogeneização da amostra, adicionar aos 225ml de Caldo Lactosado, 5ml da solução de papaína, seguindo com a homogeneização.

Caldo Lactosado suplementado com Tergitol 7 aniônico ou Triton X-100. Esterilizar o Tergitol 7 ou o Triton X-100 separadamente. Para cada 225ml de Caldo Lactosado, adicionar 2,25ml Tergitol 7 aniônico ou 2-3 gotas de Triton X-100, depois da homogeneização da amostra, descanso de 60min e ajuste do pH.

LST
CALDO LAURIL SULFATO TRIPTOSE

Aplicação. Meio seletivo para detecção presuntiva de coliformes totais, coliformes fecais e *E.coli* pelo método do NMP.

Composição

Triptose	20g
Lactose	5g
Fosfato monopotássico	2,75g
Fosfato dipotássico	2,75g
NaCl	5g
Lauril sulfato de sódio	0,1g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, acertar o pH, distribuir em tubos de 16x150mm com tubo de Durhan (10ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Lauryl Tryptose Broth (DIFCO 224150)
Lauryl Tryptose Broth (OXOID CM 451)
Lauryl Sulfate Broth (BBL 211338)
Lauryl Sulfate Broth (MERCK 1.10266)
Lauryl Sulfate Broth (ACUMEDIA 7142)

Lauryl Tryptose Concentração Dupla (LABORCLIN 910183) (meio pronto em tubos de 10ml com Durhan)
Lauryl Tryptose Concentração Simples (LABORCLIN 911169) (meio pronto em tubos de 10ml com Durhan)

m-LST-V
CALDO LAURIL SULFATO TRIPTOSE MODIFICADO VANCOMICINA

Aplicação. Meio seletivo para enriquecimento de *Enterobacter sakazakii* pelo método ISO 22964:2006.

Composição da base

Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST)	1 litro
NaCl	29g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

Suplemento

Solução aquosa de vancomicina 1mg/ml	0,1ml para 10ml de base

Preparação. Dissolver os ingredientes da base, ajustar o pH, distribuir em tubos de 16x150mm (10ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min. Aguardar resfriar e adicionar, a cada 10ml da base, 0,1ml da solução de vancomicina. **Solução de vancomicina 1mg/ml.** Dissolver 10mg de vancomicina em 10ml de água destilada, esterilizar por filtração e manter sob refrigeração (0 a 5ºC) por até 15 dias.

Equivalentes comerciais do caldo LST

Lauryl Tryptose Broth (DIFCO 224150)
Lauryl Tryptose Broth (OXOID CM 451)
Lauryl Sulfate Broth (BBL 211338)
Lauryl Sulfate Broth (MERCK 1.10266)
Lauryl Sulfate Broth (ACUMEDIA 7142)

CALDO MALONATO MODIFICADO

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de utilização do malonato.

Composição

Extrato de levedura	1g
Sulfato de amônia $(NH_4)_2SO_4$	2g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	0,6g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	0,4g
Cloreto de sódio	2g
Malonato de sódio	3g
Dextrose	0,25g
Azul de bromotimol (12,5ml da solução 0,2%)	0,025g
Água destilada	1 litro
pH 6,7±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, acertar o pH em 6,7, distribuir em tubos de 10x100mm (3-4ml/tubo) e esterilizar a121ºC/15min. **Solução 0,2% de azul de bromotimol.** Dissolver 0,1g em 2,5ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Malonate Broth Modified (DIFCO 256910)
Malonate Broth Ewing Modified (BBL 211399)

MRS
CALDO DE MAN, ROGOSA & SHARPE
(vide Ágar de Man, Rogosa & Sharpe)

CALDO NITRATO

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de redução do nitrato.

Composição

Peptona	4g
Proteose peptona Nº 3	1g
Extrato de carne	3g
Nitrato de potássio (KNO_3)	1g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, distribuir em tubos de 10x100mm (3-4ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Nitrate Broth (DIFCO 226810)
Nitrato Caldo (LABORCLIN 910026) (meio pronto em tubos)

CALDO NUTRIENTE (NB)
(vide Ágar Nutriente)

CALDO ONPG
CALDO O-NITROFENIL-β-D-GALACTOPIRANOSÍDEO

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de β-galactosidase (ONPG Teste).

Composição da base

Peptona	10g
NaCl*	5g
Água destilada	1 litro
pH 7,2 a 7,4 - 115ºC/20min	

* Quando utilizado na confirmação de *V.parahaemolyticus*, a concentração de NaCl do meio deve ser elevada a 2-3% (20-30g/l)

Suplemento

O-Nitrofenil-β-D-Galactopiranosídeo (ONPG)	0,6g
Tampão fosfato 0,01M pH 7,5	100ml
esterilizar por filtração	

Preparação. Dissolver os ingredientes da base, ajustar o pH em 8,0-8,4, ferver por 10 minutos e filtrar em papel de filtro. Resfriar à temperatura ambiente, reajustar o pH para 7,2-7,4 e esterilizar a 115ºC/20min. Separadamente, preparar uma solução 0,6% de ONPG em tampão fosfato 0,01M pH 7,5 e esterilizar por filtração. Assepticamente, adicionar 25ml da solução de ONPG a cada 75ml de base (1 parte de solução para 3 partes de base) e distribuir assepticamente em tubos de 10x100mm estéreis (2,5ml/tubo). **Tampão fosfato 0,01M pH 7,5.** Juntar 16ml de solução 0,01M de fosfato monossódico (1,38g/l de $NaH_2PO_4.H_2O$) com 84ml de solução 0,01M de fosfato dissódico (3,58g/l de $Na_2HPO_4.12H_2O$) e, se necessário ajustar o pH para 7,5 com NaOH 0,1N.

Equivalentes comerciais do suplemento

ONPG Discs (FLUKA 49940)
ONPG Discs (OXOID DD 13)
Taxo ONPG Discs for Detecting Lactose Fermenters (BBL 231248)

PSBB
CALDO PEPTONA SORBITOL BILE

Aplicação. Meio para enriquecimento de *Yersinia enterocolitica.*

Composição

Peptona	5g
Sorbitol	10g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	8,23g
Fosfato monossódico ($NaH_2PO_4.H_2O$)	1,2g
Sais biliares Nº 3	1,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,6±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Não disponível

CALDO DE PRÉ ENRIQUECIMENTO UNIVERSAL

Aplicação. Meio de pré enriquecimento recomendado pelo método do BAM/FDA para a análise de *Salmonella* em caseína láctica, suco de laranja e suco de maçã.

Composição

Triptona	5g
Proteose peptona	5g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	15g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	7g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Dextrose	0,5g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4$)	0,25g
Citrato férrico amoniacal	0,1g
Piruvato de sódio	0,2g
Água destilada	1 litro
pH, 6,3±0,2 - 121°C/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes com leve aquecimento, ajustar o pH em 6,3±0,2 e esterilizar a 121°C/15min.

Equivalentes comerciais

Universal Preenrichment Broth (Difco 223510)
Universal Preenrichment Broth (Acumedia 7510)

CALDO PÚRPURA BASE CARBOIDRATOS (vide Ágar Púrpura Base Carboidratos)

RV (R10)/RVS CALDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO CALDO RAPPAPORT-VASSILIADIS SOJA

Aplicação. Meio seletivo para enriquecimento de *Salmonella* em alimentos.

Composição do meio formulado no laboratório. Há duas formulações do Caldo Rappaport-Vassiliadis recomendadas para a análise de *Salmonella*. O Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado (RV), também chamado de R10 e o Caldo Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS). A principal diferença entre eles é a fonte da peptona usada. O método do BAM/FDA recomenda o RV. A ISO 6579 recomenda o RVS. O método do MLG/FSIS recomenda ambos. Para a formulação no laboratório, preparar separadamente as seguintes soluções:

Solução A para a formulação do RV (R10)

Triptona	5g
NaCl	8g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,6g
Água destilada	1 litro

Solução A para a formulação do RVS

Peptona de Soja	5g
NaCl	8g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,4g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	0,2g
Água destilada	1 litro

Preparação. Dissolver os ingredientes, aquecendo se necessário. Essa solução deve ser preparada no dia em que for preparado o meio completo.

Solução B

$MgCl_2.6\ H_2O$	400g
Água destilada	1 litro

Preparação. Mantendo a proporção, dissolver todo o conteúdo de um novo frasco de cloreto de magnésio na água, porque o sal é muito higroscópico. Por exemplo, adicionar 250g do sal à 625ml de água, o que vai resultar em um volume total de 788ml de solução. Acondicionar em frasco escuro, com a tampa bem apertada. Segundo a ISO 6579 (2002), a solução pode ser estocada à temperatura ambiente por até dois anos. O BAM/FDA (2001) recomenda um ano.

Solução C

Verde de malaquita oxalato (Merck)	0,4g
Água destilada	100ml

Preparação. Dissolver o corante na água e estocar em frasco escuro. Segundo a ISO 6579 (2002), a solução pode ser estocada à temperatura ambiente por até oito meses. O BAM/FDA (2001) recomenda seis meses. O BAM/FDA recomenda ainda que seja utilizado o verde de malaquita oxalato da Merck, porque outras marcas podem não ser tão efetivas.

Meio completo (formulado no laboratório)*

Solução A	1000ml
Solução B	100ml
Solução C	10ml
pH 5,2±0,2 - 115°C/15min	

* A preparação dos equivalentes comerciais é diferente, devendo ser seguida a orientação do fabricante.

Preparação do meio completo. Para preparar o meio completo, juntar 1 litro da solução A, 100ml da solução B e 10ml da solução C, ajustando o pH em 5,2±0,2. Distribuir em tubos de 16x150mm (10ml/tubo) ou em frascos com a quantidade requerida para o uso. Esterilizar a 115ºC/15min. A ISO 6579 (2002) recomenda estocar a 3±2°C até o momento do uso e usar no mesmo dia. O BAM/FDA recomenda estocar sob refrigeração por até um mês.

Equivalentes comerciais da formulação RVS

Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth (RVS) (Oxoid CM 866)
Rappaport-Vassiliadis Broth (RVS) (Merck 1.07700)

Equivalentes comerciais da formulação RV*

Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (Difco 218581)
Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (Acumedia 7512)
Rapapport Caldo (LABORCLIN 910080) (meio pronto em tubos com 9ml)

*O BAM/FDA não recomenda o uso dos equivalentes comerciais, mas sim, a preparação no laboratório, a partir dos ingredientes da formulação.

CALDO ROGOSA SL
(vide Ágar Rogosa SL)

SC
CALDO SELENITO CISTINA

Aplicação. Caldo para enriquecimento seletivo de *Salmonella* em alimentos.

Composição

Triptona	5g
Lactose	4g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	10g
Selenito ácido de sódio	4g
L-Cistina	0,01g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - Fervura/10min	

Preparação. Dissolver os ingredientes na água destilada, acertar o pH em 7,0, distribuir em tubos de 16x150mm (10ml/tubo) e submeter à fervura por 10 minutos. Não autoclavar. A altura do meio no tubo não deve ser inferior a 5cm, porque o meio é mais eficiente quando apresenta potencial de óxido-redução reduzido. **Cuidado.** Os sais de selenito são tóxicos quando inalados ou ingeridos. Manusear com cuidado, utilizando máscara.

Equivalentes comerciais

Selenite Cystine Broth (DIFCO 268740)
Selenite Cystine Broth (MERCK 1.07709)
Selenite Cystine Broth (ACUMEDIA 7283)

OSB
CALDO SORO DE LARANJA
(vide Ágar Soro de Laranja)

CALDO T1N0 e T1N3
(vide Ágar T1N1)

TT
CALDO TETRATIONATO

Aplicação. Meio de enriquecimento seletivo, recomendado pela FDA para a análise de *Salmonella*..

Composição da base

Proteose peptona	2,5g
Peptona de caseína digestão pancreática	2,5g
Oxgall	1g
Tiossulfato de sódio	30g
Carbonato de cálcio	10g
Água destilada	1 litro
pH 8,4±0,2 – aquecer até a fervura	

Suplemento

Solução de iodo	0,2ml/10ml base
Solução 0,1% de verde brilhante (opcional)	0,1ml/10ml base

Preparação. Suspender os ingredientes da base e aquecer até a fervura. Não autoclavar. O precipitado não vai dissolver completamente. No momento do uso adicionar, a cada litro de base, 20ml de solução de iodo e 10ml de solução 0,1% de verde brilhante. Ajustar o pH em 8,4 ± 0,2, se necessário, e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade necessária para o uso. Utilizar imediatamente, o meio completo não deve ser estocado.

Preparo da solução de iodo

Iodo	6g
Iodeto de potássio (KI)	5g
Água destilada	20ml

Colocar o iodo e o iodeto de potássio num almofariz e homogeneizar com o pistilo. Adicionar, consecutivamente, porções de 1ml, 5ml e 10ml de água destilada, homogeneizando a solução após cada adição. Em seguida, transferir a solução para um frasco escuro, lavando o almofariz e o pistilo com o restante da água destilada.

Preparo da solução 0,1% de verde brilhante

Verde brilhante	0,1g
Água destilada	100ml

Dissolver 0,1g de verde brilhante em 100ml de água destilada, ferver por 10 minutos ou esterilizar por filtração. Armazenar em frasco escuro, sob refrigeração.

Equivalentes comerciais da base

Tetrathionate Broth Base (DIFCO 210430)
Tetrathionate Broth Base (MERCK 1.05285)
Tetrathionate Broth USA (OXOID CM 671)
Tetrathionate Broth Base (ACUMEDIA 7241)
Tetrationato Caldo (LABORCLIN 510162) (meio pronto em tubos com 10ml, já contem verde brilhante)

TTH
CALDO TETRATIONATO HAJNA

Aplicação. Meio de enriquecimento seletivo recomendado pelo MLG/FSIS para a análise de *Salmonella.*

Composição da base

Extrato de levedura	2g
Triptose	18g
Dextrose	0,5g
D-manitol	2,5g
Desoxicolato de sódio	0,5g
Cloreto de sódio	5g
Tiossulfato de sódio	38g
Carbonato de cálcio	25g
Verde brilhante	0,01g
Água destilada	1 litro
pH 7,6±0,2 – aquecer até a fervura	

Suplemento

Solução de iodo	40ml/l base

Preparação. Dissolver os ingredientes da base aquecendo até a fervura. Não autoclavar. No momento do uso adicionar, a cada litro de base, 40ml de solução de iodo e ajustar o pH em 7,6 ± 0,2, se necessário. Misturar bem e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade necessária para o uso. Utilizar imediatamente, o meio completo não deve ser estocado.

Preparo da solução de iodo

Iodo cristais	5g
Iodeto de potássio (KI)	8g
Água destilada	Completar para 40ml

Dissolver o iodeto de potássio em 20ml de água destilada estéril, adicionar o iodo e agitar até a completa dissolução. Completar o volume para 40ml com água destilada estéril. Não aquecer. Acondicionar em frasco escuro (protegido da luz) e estocar a 4ºC.

Equivalentes comerciais da base

TT Broth Base Hajna (DIFCO 249120)

MKTTn
CALDO TETRATIONATO MULLER KAUFFMANN NOVOBIOCINA

Aplicação. Meio de enriquecimento seletivo recomendado pela ISO 6579 para a análise de *Salmonella*.

Composição da base

Extrato de carne	4,3g
Triptona (ou outro produto de digestão enzimática da caseína)	8,6g
Cloreto de sódio (NaCl)	2,6g
Carbonato de cálcio ($CaCO_3$)	38,7g
Tiossulfato de sódio pentahidratado ($Na_2S_2O_3.5H_2O$) (anidro 30,5g)	47,8g
Ox bile para uso bacteriológico	4,78g
Verde brilhante	9,6mg
Água destilada	1 litro
pH 8,2±0,2 – fervura/5min	

Suplemento

Solução de iodo	20ml/l base
Solução 0,8% de novobiocina	5ml/l base

Preparação. Dissolver os ingredientes da base fervendo por 5 minutos. Não autoclavar. Ajustar o pH em 8,2 ± 0,2, se necessário e misturar bem. Estocar a 3±2ºC por até 4 semanas. No momento do uso, adicionar a cada litro de base, 5ml da solução de novobiocina, misturar bem e adicionar 20ml da solução de iodo. Misturar bem e distribuir em tubos de 16x150mm (10ml/tubo) ou em frascos, na quantidade necessária para o uso. Utilizar imediatamente, o meio completo não deve ser estocado.

Preparo da solução de iodo

Iodo	20g
Iodeto de potássio (KI)	25g
Água destilada	100ml

Dissolver completamente o iodeto de potássio em 10ml de água destilada estéril, adicionar o iodo e diluir a 100ml com água destilada estéril. Não aquecer. Acondicionar em frasco escuro (protegido da luz) com tampa bem apertada e estocar à temperatura ambiente.

Preparo da solução 0,8% de novobiocina

Novobiocina (sal sódico)	0,04g
Água destilada	5ml

Dissolver a novobiocina na água destilada e esterilizar por filtração. Estocar por até 4 semanas a 3±2ºC.

Equivalentes comerciais da base

Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (Merck 1.05878)

TAB
CALDO THERMOACIDURANS
(vide Ágar Caldo Thermoacidurans)
(também chamado de Caldo Ácido)

TSB
CALDO TRIPTICASE DE SOJA
(vide Ágar Tripticase de Soja)

CALDO TRIPTONA 1%

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de indol.

Composição*

Triptona	10g
NaCl	5g
Água destilada	1 litro
pH 7,3±0,2 - 121ºC/15min	

* A formulação descrita pela ISO 6579:2002 para a análise de *Salmonella* inclui ainda 1g/l de DL-Triptofano.

Preparação. Dissolver os ingredientes na água destilada, distribuir em tubos de 10x100mm (4-5ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15minutos.

Equivalentes comerciais

Tryptone Water (MERCK 1.10859) (sem triptofano)
Tryptone Water (OXOID CM 87) (sem triptofano)
Tryptone Water (DIFCO 264410) (sem triptofano)
Triptone Caldo (LABORCLIN 910012) (meio pronto em tubos, inclui 1g/l de L-Triptofano)

Modificações

Caldo Triptona com 0,1% Triptofano. Usado no teste de indol descrito pela ISO 6579 (2002) para a análise de *Salmonella*, é preparado adicionando 1g/l de DL-Triptofano ao meio, antes da esterilização.

Caldo Triptona com 0, 3, 6, 8 e 10% de NaCl. Usado na análise de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, para os testes de crescimento em presença/ausência de NaCl. É preparado adicionando o sal nas quantidades requeridas, ou seja, zero, 30, 60, 80 ou 100g/l, antes da esterilização. Os equivalentes comerciais contém 0,5% de NaCl e não podem ser usados para o teste de crescimento na ausência de sal.

UVM
CALDO UNIVERSIDADE DE VERMONT

Aplicação. Meio de enriquecimento seletivo para detecção de *L.monocytogenes* em alimentos, método do *Microbiology Laboratory Guidebook* (MLG/FSIS, 2005).

Composição da base

Proteose peptona	5g
Triptona	5g
Extrato de carne	5g
Extrato de levedura	5g
Cloreto de sódio (NaCl)	20g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	9,6g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,35g
Esculina	1g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Suplementos estéreis

Ácido nalidíxico (0,9ml da solução aquosa 0,5%/225ml de base)	20mg/litro de base
Acriflavina HCl (0,54ml da solução aquosa 0,5%/225ml de base)	12mg/litro de base

Preparação. Preparar a base, ajustar o pH em 7,4 e esterilizar a 121ºC/15min. Preparar separadamente as seguintes soluções, esterilizadas por filtração: solução aquosa 0,5% de ácido nalidíxico e solução aquosa 0,5% de acriflavina HCl. Estocar em frasco escuro, sob refrigeração. No momento do uso, adicionar a cada 225ml de base, 0,9ml da solução de ácido nalidíxico e 0,54ml de solução de acriflavina HCl.

Equivalentes comerciais

Listeria Enrichment Broth Base UVM Formulation (OXOID CM 863) + *Listeria* Primary Selective Enrichment Supplement UVM I Formulation (OXOID SR 142)

UVM Modified Listeria Enrichment Broth (DIFCO 222330) (já contem ácido nalidíxico e acriflavina)

UVM Modified Listeria Enrichment Broth (ACUMEDIA 7409) (já contem ácido nalidíxico e acriflavina)

CALDO URÉIA DE CHRISTENSEN
(vide Ágar Uréia de Christensen)

CALDO URÉIA RÁPIDO

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de urease rápido. Recomendado para confirmação de *Salmonella* no método BAM/FDA (Andrews & Hammack, 2005).

Composição

Uréia	20g
Extrato de levedura	0,1g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4) (1ml da solução aquosa 9,5%)	0,095g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) (1ml da solução aquosa 9,1%)	0,091g
Vermelho de fenol (5ml da solução 0,2%)	0,01g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - esterilizar por filtração	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterlizar for filtração com filtro membrana de 0,45µm. Distribuir em tubos estéreis de 10x100mm (1,5 a 3ml/tubo). **Solução 0,2% de vermelho de fenol.** Dissolver 0,1g em 4ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada.

Equivalentes comerciais

Não disponível

CALDO URÉIA DE RUSTIGIAN & STUART

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de urease. Recomendado para confirmação de *Salmonella* no método BAM/FDA (Andrews & Hammack, 2005).

Composição

Uréia	20g
Extrato de levedura	0,1g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) ou dissódico (Na_2HPO_4)	9,5g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	9,1g
Vermelho de fenol	0,01g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - esterilizar por filtração	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterlizar for filtração com filtro membrana de 0,45µm. Distribuir em tubos estéreis de 10x100mm (1,5 a 3ml/tubo).

Equivalentes comerciais
Urea Broth (DIFCO 227210)
Urea Broth (MERCK 1.08483)

VB
CALDO VERDE BRILHANTE BILE 2%

Aplicação. Meio seletivo para contagem de coliformes totais.

Composição

Bile de boi ("oxgall")	20g
Peptona	10g
Lactose	10g
Verde brilhante (13,3ml da solução aquosa 0,1%)	0,0133g
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, acertar o pH , distribuir em tubos de 16x150mm com tubo de Durhan (aproximadamente 6ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais
Brilliant Green Bile Broth 2% (DIFCO 274000)
Brilliant Green Bile Broth 2% (OXOID CM 31)
Brilliant Green 2% Bile Broth (MERCK 1.05454)
Brilliant Green Bile Broth 2% (ACUMEDIA 7119)
Brilliant Green Bile 2% (LABORCLIN 910168) (meio pronto em tubos com Durhan)

CALDO VERMELHO DE FENOL-CARBOIDRATOS
(vide Ágar Vermelho de Fenol - Carboidratos)

CALDO VM VP

Aplicação. Meio para prova bioquímica, testes de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer.

Composição

Peptona	7g
Glicose	5g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	5g
Água destilada	1 litro
pH 6,9±02 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes na água destilada, acertar o pH em 6,9 e distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo). Esterilizar a 121ºC/15minutos.

Equivalentes comerciais

MR-VP Broth (ACUMEDIA 7237)
MR-VP Broth (BBL 211383)
MR-VP Broth (MERCK 1.05712)
MR-VP Medium (DIFCO 216300)
MR-VP Medium (OXOID CM 43)

CALDO VP MODIFICADO PARA *BACILLUS*

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de Voges Proskauer para *Bacillus.*

Composição

Proteose peptona	7g
Glicose	5g
NaCl	5g
Água destilada	1 litro
pH 6,9±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, distribuir em tubos de 10x100mm (3-4ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min.

Eqivalentes comerciais

Não disponível

DISCOS DE INDOXIL ACETATO

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de hidrólise do indoxil acetato. Usado na análise de *Campylobacter* pelo método ISO 10272 (2006).

Preparação. Dissolver 0,1g de indoxil acetato (sinônimos: 3-acetoxindol ou ácido acético 3-indolil ester) em 1ml de acetona. Distribuir porções de 25 a 50µl dessa solução em discos de papel de filtro branco, com diâmetro de 0,6 a 1,2cm. Aguardar que os discos sequem à temperatura ambiente e estocar sob refrigeração (4°C), em frasco escuro, na presença de silica gel.

Equivalentes comerciais

Indoxyl Strips (Acetoxyindol Strips) (Fluka 04739)

ESCALA DE McFARLAND

Preparação. Preparar uma solução 1% (volume/volume) de ácido sulfúrico e uma solução 1% (peso/volume) de cloreto de bário. Misturar, em tubos separados, as seguintes quantidades de cada uma das soluções, para obter os padrões da escala:

Padrão da Escala Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume de solução de cloreto de bário (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Volume de solução de ácido sulfúrico (ml)	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
Concentração aproximada de microrganismos ($x10^6$/ml)	300	600	900	1.200	1.500	1.800	2.100	2.400	2.700	3.000

Distribuir as soluções padrão da escala em tubos pequenos (3ml/tubo), selecionando tubos com as paredes bem transparentes, uniformes e livres de riscos e defeitos, para leitura de absorbância.

Equivalentes comerciais

API McFarland Kit (BioMerieux 70900)

MacFarland Equivalence Turbidity Standard Set (OXOID/REMEL R 20421)

ETANOL 70%

Aplicação. Também chamado de álcool 70%, é um desinfetante para uso geral no laboratório.

Preparação

Para preparar um litro de etanol 70%, seguir a equação V1 = C2xV2/C1, onde

V1 é a quantidade de álcool que deve ser misturada com água, para completar um litro de etanol 70%

C1 é a concentração inicial do álcool a ser usado para preparar o etanol 70% (absoluto ou 96°).

C2 é a concentração final desejada, de 70%.

V2 é o volume final de álcool 70% a ser preparado, de 1000ml.

Preparação a partir do etanol absoluto. V1 = 70x1000/100 = 700ml. Misturar 700ml de etanol absoluto com 300ml de água destilada.

Preparação a partir do etanol 96º. V1 = 70x1000/96 = 730ml. Misturar 730ml de etanol 96º com 270ml de água destilada.

LEITE EM PÓ DESNATADO RECONSTITUÍDO

Aplicação. Meio de pré-enriquecimento para detecção de *Salmonella* em amostras de cacau, chocolate, balas, confeitos e coberturas para confeitos, método BAM/FDA (Andrews & Hammack, 2005).

Composição

Leite desnatado em pó	100g
Água destilada	1 litro
121ºC/15min	

Preparação. Reconstituir o leite em pó e esterilizar a 121ºC/15min. Após a inoculação, descanso de 60min e ajuste do pH da amostra, suplementar cada 225ml de leite com 4,5ml de solução aquosa 0,1% de verde brilhante estéril (ou 0,45ml da solução 1%). **Solução 0,1% de verde brilhante.** Dissolver 0,1g de verde brilhante em 100ml de água destilada e esterilizar por filtração. Estocar em frasco escuro, sob refrigeração.

Eqüivalentes comerciais

Não disponível

Modificações

Leite em pó desnatado dissolvido em Tampão Fosfato (0,1g/100ml). Recomendado no Capítulo 9 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wher & Frank, 2004), para a preparação de amostras de iogurtes e outros produtos fermentados ou acidificados. Para a formulação, adicionar 1g de leite em pó desnatado em um litro de tampão fosfato e esterilizar a 121ºC/15min.

LEITE TORNASSOLADO (LITMUS MILK)

Aplicação: meio para confirmação de *Clostridium perfringens* na análise de água pelo método dos tubos múltiplos CETESB 1993.

Composição

Leite em pó desnatado	100g
Tornassol (litmus)	0,75g
Água destilada	1 litro
pH 6,8 ± 0,2 - 121ºC/15min	

Preparação: dissolver os ingredientes na água destilada, acertar o pH em 6,8, distribuir em tubos e esterilizar a 121ºC/15minutos.

Equivalentes Comerciais:

Litmus Milk (BBL 211343)

CMM
MEIO DE CARNE COZIDA

Aplicação. Meio de cultivo para bactérias anaeróbias, usado no teste de esterilidade comercial e teste de diagnóstico da causa da deterioração de enlatados de baixa acidez.

Composição

Coração de boi	450g
Proteose peptona	20g
Dextrose.	2g
NaCl	5g
Água destilada.	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121º/15min	

Preparação. Distribuir 1,25g das partículas do meio sólido em tubos de 20x180mm e adicionar 10ml de água destilada a cada tubo. Manter em repouso por 15 minutos, para a reidratação das partículas, e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Cooked Meat Broth (MERCK 1.10928)
Cooked Meat Medium (ACUMEDIA 7110)
Cooked Meat Medium (DIFCO 226730)
Cooked Meat Medium (OXOID CM 81)

Modificações

CMM suplementado com 0,1% de amido solúvel e 0,1% de glicose. Usado na contagem de esporos de mesófilos anaeróbios, para a detecção de clostrídios não proteolíticos. Suspender 1g de amido solúvel e 1g de glicose em 1 litro de água destilada e aquecer até gelatinizar o amido. Usar em lugar da água destilada, para hidratar as partículas do CMM (15min) e, então , esterilizar o meio completo.

MEIO DE FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS
PARA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de fermentação de carboidratos para *C.perfringens.*

Composição

Tripticase	10g
Neopeptona	10g
Ágar	2g
Tioglicolato de sódio	0,25g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Suplemento estéril

Carboidrato (Solução 10%)	1ml/9ml de meio base

Preparação. Preparar a base, aquecendo com agitação para a completa dissolução dos ingredientes e fusão do ágar. Distribuir em tubos de 16x150mm (9ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min. Preparar separadamente uma solução aquosa a 10% do carboidrato a ser testado, esterilizar por filtração e estocar sob refrigeração. No momento do uso, ferver os tubos com a base por 15 minutos em banho, para desaeração, resfriando imediatamente a 55-50ºC, em banho de gelo. Adicionar assepticamente, a cada 9ml de base, 1ml da solução de carboidrato. Não inclinar. **Solução 0,04% de azul de bromotimol para teste de fermentação.** Dissolver 0,1g do azul de bromotimol em 16ml de NaOH 0,01N e completar o volume para 250ml com água destilada.

Eqüivalentes comerciais

Não disponível

MLG
MEIO DE LACTOSE GELATINA

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina para *C.perfringens*.

Composição

Triptose	15g
Extrato de levedura	10g
Lactose	10g
Vermelho de fenol (5ml da solução alcoólica 1%)	0,05g
Gelatina	120g
Água destilada	completar para 1 litro
pH 7,5±0,2 - 121ºC/10min	

Preparação. Dissolver a triptose, o extrato de levedura e a lactose em 400ml de água destilada, aquecendo se necessário. Suspender a gelatina em 600ml de água destilada e aquecer até a fusão. Juntar as duas soluções e ajustar o pH em 7,5+0,2. Adicionar os 5ml da solução de vermelho de fenol e misturar bem. Distribuir em tubos de 16x150mm (10ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/10min. Se o meio não for usado no intervalo de oito horas depois de preparado, desaerar antes do uso, aquecendo em banho a 50-70°C/2-3h. **Solução 1% de vermelho de fenol.** Dissolver 1g em 100ml de etanol 95%.

Equivalentes comerciais

Lactose Gelatina (LABORCLIN 910010) (meio pronto em tubos)

MEIO DE LEITE FERRO

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de coagulação tempestuosa do leite, usado na confirmação de *C. perfringens.*

Composição/Preparação. Distribuir 10ml de leite integral pasteurizado em tubos de 16x150mm com um prego de ferro no fundo. Esterilizar a 116ºC/10min e utilizar no máximo duas horas após o preparo, pois o meio não pode ser reaquecido para desaeração. Alternativamente, em lugar do prego, dissolver 1g de sulfato ferroso ($FeSO_4.7H_2O$) em 50ml de água destilada estéril, adicionar lentamente em um litro de leite, agitando continuamente em agitador magnético. Distribuir então nos tubos e esterilizar da mesma forma.

Equivalentes comerciais

Não disponível

OF
MEIO DE OXIDAÇÃO FERMENTAÇÃO
(para bactérias gram negativas)

Aplicação. Meio para prova bioquímica, teste de oxidação/fermentação da glicose e outros carboidratos para bactérias Gram negativas.

Composição da base

Triptona	2g
NaCl	5g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	0,3g
Azul de bromotimol (40ml da solução 0,2%)	0,08g
Ágar	2g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Preparar a base e esterilizar a 121ºC/15min, em porções de 100ml. Separadamente, preparar uma solução 10% de glicose ou outro caboidrato a ser testado, e esterilizar por filtração. Resfriar a base a 50ºC e adicionar assepticamente, a cada 100ml de base, 10ml da solução de carboidrato, para concentração final de 1%. Distribuir assepticamente em tubos estéreis de 10x100mm (5ml/tubo) ou 16x150mm (13ml/tubo). **Solução 0,2% de azul de bromotimol.** Dissolver 0,1g em 2,5ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50ml com água destilada

Equivalentes comerciais

OF Basal Medium (DIFCO 268820)

OF Basal Medium Hugh & Leifson (MERCK 1.10282)

MEIO PE-2

Aplicação. Meio para cultivo de bactérias anaeróbias, utilizado na detecção de esporos de clostrídios mesófilos e termófilos.

Composição

Peptona	20g
Extrato de levedura	3g
Púrpura de bromocresol (solução 2%)	2ml
Água destilada	1 litro
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes e distribuir em tubos de 20x180mm (18-20ml/tubo) com tampas rosqueadas. Adicionar a cada tubo 8 a 10 ervilhas naturais frescas ou secas, isentas de agrotóxicos, e deixar em repouso por 1 hora, para a completa reidratação das ervilhas. Após o período de repouso, esterilizar a 121ºC/15min. **Solução 2% de púrpura de bromocresol.** Dissolver 2g em 10ml de etanol e completar o volume para 100ml com água destilada. **Observação.** Para o sucesso das análises, é importante garantir a ausência de resíduos de pesticidas nas ervilhas e que, antes da esterilização, as ervilhas permaneçam uma hora de molho no caldo de cultura, para garantir a eficiência da esterilização. Tubos não utilizados podem ser submetidos a novo processo de esterilização, sem prejuízo das análises.

Equivalentes comerciais

Não disponível

RCM
MEIO REFORÇADO PARA CLOSTRÍDIOS

Aplicação. Meio para contagem de esporos de anaeróbios mesófilos em leite fluído e queijos pela técnica do NMP, conforme descrito no item 8.100 do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wher & Frank, 2004)

Composição

Peptona	5g
Extrato de carne	10g
Extrato de levedura	3g
D(+) Glicose	5g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Acetato de sódio	3g
Cloridrato de cisteína	0,5g
Amido solúvel	1g
Ágar	0,5g
Água destilada estéril	1 litro
pH 6,8±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Suspender os ingredientes, ferver até a fusão do ágar e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Reinforced Costridial Medium (DIFCO 218081)
Reinforced Costridial Medium (MERCK 1.05411)
Reinforced Costridial Medium (OXOID CM 149)

RCML
MEIO REFORÇADO PARA CLOSTRÍDIOS COM LACTATO

Aplicação. Meio para contagem de esporos de anaeróbios mesófilos em leite fluído e queijos pela técnica do NMP, para favorecer *Clostridium tyrobutyricum.* Descrito no item 8.100 do Capítulo 8 do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Wher & Frank, 2004)

Composição

Extrato de carne	10g
Extrato de levedura	3g
Triptona	10g
Lactato de sódio solução 72%	28g
Acetato de sódio	5g
Cloridrato de cisteína	0,5g
Amido solúvel	1g
Ágar	1g
Água destilada estéril	1 litro
pH 5,5 a 5,7 (ajustado com solução aquosa 20% de ácido láctico) - 120±1ºC/15min	

Preparação. Suspender os ingredientes, ajustar o pH em 5,5 a 5,7 com uma solução aquosa 20% de ácido láctico e esterilizar a 120±1ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Não disponível

MEIO TESTE DE MOTILIDADE

Aplicação. Meio semi-sólido para teste de motilidade.

Composição

Extrato de carne	3g
Peptona de caseína ou gelatina (digestão enzimática)	10g
Cloreto de sódio (NaCl)*	5g
Ágar	4g
Água destilada	1 litro
pH 7,3±0,2 - 121ºC/15min	

* Quando utilizado na confirmação de *V.parahaemolyticus* a concentração de NaCl deve ser elevada para 20-30g/l.

Preparação. Suspender os ingredientes na água destilada e ajustar o pH em 7,2. Aquecer até a completa fusão do ágar, distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo) e esterilizar a 121°C/15min. Não inclinar, o meio deve solidificar na posição vertical.

Equivalentes comerciais

Motility Test Agar (ACUMEDIA 7247)
Motility Test Mediun (BBL 211436)

MEIO TESTE DE MOTILIDADE ISO

Aplicação. Meio semi-sólido para teste de motilidade nos métodos ISO.

Composição

Peptona de caseína (digestão enzimática)	20g
Peptona de tecido animal (digestão enzimática)	6,1g
Ágar	3,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,3±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Suspender os ingredientes na água destilada e ajustar o pH em 7,3. Aquecer até a completa fusão do ágar, distribuir em tubos de 10x100mm (5ml/tubo) e esterilizar a 121°C/15min. Não inclinar, o meio deve solidificar na posição vertical.

Equivalentes comerciais

Não disponível

TGM
MEIO DE TIOGLICOLATO

Aplicação. Meio para manutenção de clostrídios e para verificação do requerimento de oxigênio para crescimento (aeróbio, anaeróbio facultativo, anaeróbio estrito).

Composição

Peptona de caseína (digestão pancreática)	15g
Extrato de levedura	5g
Glicose	5,5g
NaCl	2,5g
L-cistina	0,5g
Tioglicolato de sódio	0,5g
Ágar	0,75g
Rezarzurina (0,01ml da solução aquosa 0,1%)	0,001g
Água destilada	1 litro
pH 7,1±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, aquecer até a completa fusão do ágar, distribuir em tubos de 16x150mm (10ml/tubo) e esterilizar a 121ºC/15min.

Equivalentes comerciais

Fluid Thioglycollate Medium (ACUMEDIA 7137)
Fluid Thioglycollate Medium (BBL 211260)
Fluid Thioglycollate Medium (DIFCO 225650)
Fluid Thioglycollate Medium (MERCK 1.08191)
Thioglycollate Medium USP (OXOID CM 173)
Tioglicolato Caldo (LABORCLIN 510055) (meio pronto em tubos)

MISTURA AQUOSA DE GOMA TRAGACANTO E GOMA ARÁBICA

Aplicação. Usada para o choque térmico na contagem de esporos de termofílicos aeróbios totais e "flat-sour" em creme de leite.

Preparação. Misturar 2g de goma tragacanto e 1g de goma arábica em 100ml de água destilada e esterilizar a 121°C/20min.

ÓLEO MINERAL ESTÉRIL

Aplicação. Selar superfície de caldos de cultura para cultivo em condições anaeróbias.

Preparação. Esterilizar a 121°C/30min.

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 3%

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de catalase.

Composição

Peróxido de hidrogênio 30%	10ml
Água destilada	90ml

Preparação. Dissolver 10ml de água oxigenada 30% em 90ml de água destilada. **Cuidado.** O peróxido de hidrogênio a 30% pode provocar queimaduras dolorosas, devendo ser manuseado com luvas e óculos protetores. Em caso de respingos na pele, lavar com etanol 70% em abundância. Não lavar com água!

Equivalentes comerciais

Catalase Reagent Dropper (BBL 261203)
Bactident Catalase (MERCK 1.11351)

REAGENTES DE BARRIT PARA TESTE DE VP
(solução 40% de hidróxido de potássio ou sódio)
(solução 5% de alfa-naftol)

Aplicação. Reagentes para prova bioquímica, teste de Voges-Proskauer.

Solução 5% de alfa-naftol*

Alfa-naftol	5g
Etanol absoluto	completar para 100ml

* **O reagente recomendado pela ISO 6579:2002 é preparado com 6g de 1-naftol dissolvido em 100ml de etanol 96%.**

Dissolver o alfa-naftol em menos de 100ml de etanol, transferir para um balão volumétrico e adicionar o etanol restante, completando o volume para 100ml. Estocar em geladeira. **Cuidado.** O reagente não deve ser pipetado com a boca, utilizar uma pera ou um pipetador.

Solução 40% de hidróxido de potássio ou sódio

KOH (ou NaOH)	40g
Água destilada	completar para 100ml

Pesar o KOH rapidamente (é altamente higroscópico) e dissolver em menos de 100ml de água destilada, em um bequer colocado em banho de água fria, para controlar a elevação da temperatura durante a dissolução. Aguardar resfriar e completar o volume para 100ml com água destilada. Estocar sob refrigeração, em frasco de polietileno ou em frasco de vidro com a boca e a tampa parafinadas. **Cuidado.** A solução é extremamente cáustica, podendo causar queimaduras dolorosas à pele. Manusear com cuidado e, em caso de acidente, lavar com água em abundância.

Equivalentes comerciais

Voges-Proskauer A Reagent Dropper (5% Alpha Naphthol) (BBL 261192)
Barrit's Reagent A (5% Alpha Naphthol) (Fluka 29333)
Voges-Proskauer B Reagent Dropper (40% Potassium Hydroxide) (BBL 261193)
Barrit's Reagent B (40% Potassium Hydroxide) (Fluka 39442)

REAGENTE DE β-GALACTOSIDASE (ONPG)
(orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo)

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de atividade de β-galactosidase.

Solução tampão

Fosfato monossódico (NaH_2PO_4)	6,9g
Hidróxido de sódio (solução 10mol/l) (para ajustar o pH)	cerca de 3ml
Água destilada	completar para 50ml

Dissolver o fosfato monossódico em cerca de 45ml de água destilada, em balão volumétrico. Ajustar o pH em 7,0±0,2 com uma solução de hidróxido de sódio 10M (são necessários cerca de 3ml). Completar o volume para 50ml com água destilada.

Solução ONPG

O-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo (ONPG)	0,08g
Água destilada	15ml

Dissolver o ONPG na água a aproximadamente 50°C e resfriar.

Reagente completo

Solução tampão	5ml
Solução ONPG	15ml

Misturar o tampão e a solução de ONPG.

Equivalentes comerciais

Os equivalentes comerciais são discos impregnados com o reagente, devendo ser obedecida a orientação do fabricante para a preparação e para o teste.

ONPG Discs (Oxoid DD013)
ONPG Discs (Fluka 49940)
Taxo ONPG Discs (BBL 231249)

REAGENTE DE β-GLICOSIDASE

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de atividade da enzima β-glicosidase. Usado na confirmação de *Y. enterocolitica.*

Preparação. Preparar o reagente adicionando 0,1g de 4-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo em 100ml de solução aquosa 0,666M de fosfato monossódico (NaH_2PO_4) pH 6,0. Dissolver e esterilizar por filtração.

REAGENTES PARA COLORAÇÃO DE ESPOROS

Solução 5% de verde de malaquita

Verde de malaquita oxalato	5g
Água destilada	100ml

Solução 0,5% de safranina O

Safranina O	0,5g
Água destilada	100ml

Dissolver os reagentes de cada solução em água destilada e estocar em frasco escuro.

REAGENTES PARA COLORAÇÃO DE GRAM

Solução de cristal violeta de Hucker

Solução A

Cristal violeta (90% pureza)	2g
Etanol 95%	20ml

Solução B

Oxalato de amônio monohidratado	0,2g
Água destilada	20ml

Misturar as soluções A e B, deixar em repouso por 24 horas e filtrar em papel de filtro comum. Estocar em frasco escuro.

Solução de iodo (Lugol)

Iodo	1g
Iodeto de potássio (KI)	2g
Água destilada	300ml

Colocar o iodeto de potássio num almofariz, adicionar o iodo e homogeneizar com o pistilo. Adicionar, consecutivamente, porções de 1ml, 5ml e 10ml de água destilada, homogeneizando a solução após cada adição. Em seguida, transferir a solução para um frasco escuro, lavando o almofariz e o pistilo com o restante da água destilada.

Solução de safranina (contra-corante)

Safranina O	0,25g
Etanol 95%	10ml
Água destilada	100ml

Dissolver a safranina no álcool e adicionar a solução resultante aos 100 ml de água destilada.

Equivalentes comerciais

Gram Stain Kit (BD 212524) (Conjunto completo)
Gram Crystal Violet (BD 212525)
Gram Iodine (BD 212529)
Gram Decolorizer (BD 212527)
Gram Safranin (BD 212531)
Gram Color Staining Set (MERCK 1.11885) (Conjunto completo)
Gram's Crystal Violet Solution (MERCK 1.09218)
Gram's Lugol Solution (MERCK 1.09261)
Gram's Safranine Solution (MERCK 1.09217)
Conjunto Coloração Gram (Laborclin 620520 ou 620521)

REAGENTE DE KOVACS PARA TESTE DE INDOL (solução alcoólica 5% p-dimetilaminobenzaldeído)

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de indol. Não confundir com o reagente de Kovacs para teste de oxidase.

Composição

p-dimetilaminobenzaldeído (sinônimo 4-dimetilaminobenzaldeído)	5g
Álcool amílico, isoamílico ou butílico	75ml
Ácido clorídrico concentrado	25ml

Preparação. Em uma capela de exaustão, dissolver completamente o p-dimetilaminobenzaldeído no álcool amílico, aquecendo levemente em banho-maria (50-60ºC), se necessário. Adicionar lenta e cuidadosamente o ácido clorídrico concentrado à solução, deixando o líquido escorrer lentamente pela parede do frasco, sem provocar respingos. Descartar a pipeta em um frasco com água, lavando todo o ácido das paredes. Estocar o reagente sob refrigeração, em frasco de vidro escuro com tampa de vidro. Recomenda-se que, sempre que possível, seja preparado no momento do uso ou estocado por não mais de uma semana, porque a estabilidade pode variar de alguns dias a semanas. A cor deve ser amarela e o pH inferior a 6,0. Recomenda-se álcool amílico Merck ou de qualidade equivalente, porque, dependendo da marca, o reagente pode apresentar cor verde ou esverdeada. Nesse caso, descartar e substituir o álcool. **Cuidado.** O ácido clorídrico concentrado é extremamente corrosivo, podendo causar danos muito graves e dolorosos à pele e aos olhos. Em caso de acidente, lavar com água em abundância. Nenhum dos componentes, bem como o reagente pronto, devem ser pipetados com a boca, devendo ser utilizada uma pera ou um pipetador.

Equivalentes comerciais

Bactident Indole (MERCK 1.11350)
Kovacs Indole Reagent (MERCK 1.09293)
DrySlide Indole (BBL 231748)
Indole Reagent Dropper (BBL 261185)

REAGENTE DE KOVACS PARA TESTE DE OXIDASE (solução 1% de cloridrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina)

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de oxidase. Não confundir com o reagente de Kovacs para teste de indol.

Composição

Cloridrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilenodiamina	1g
Água destilada	100ml

Preparação. Dissolver o reagente em 100ml de água destilada, aquecendo levemente para a completa dissolução. Utilizar imediatamente pois o reagente é instável. Havendo interesse em estocar, deve-se distribuir porções de 1-2ml em pequenos frascos escuros e congelar a -20ºC. Descongelar 3 a 4 horas antes do uso e descartar todo o volume descongelado que não for utilizado. Utilizar preferencialmente os equivalentes comerciais.

Equivalentes comerciais

Dry Slide Oxidase (BBL 231746)
Oxidase Reagent Dropper (BBL 261181)
Bactident Oxidase (MERCK 1.13300)
Oxidase Identification Sticks (Oxoid BR 0064)
Tiras para Teste de Oxidase (LABORCLIN 570661)

REAGENTES PARA TESTE DE CATALASE
(vide peróxido de hidrogênio 3%)

REAGENTES PARA TESTE DE NITRATO
(solução 0,8% ácido sulfanílico)
(solução 0,5% alfa-naftol)

Aplicação. Reagentes para prova bioquímica, teste de redução do nitrato.

Reagente A (solução 0,8% de ácido sulfanílico)

Ácido sulfanílico	1g
Ácido acético (5N) 30%	125ml

Dissolver o ácido sulfanílico no ácido acético 5N, aquecendo para a completa dissolução. Filtrar em papel de filtro e estocar em frasco escuro, à temperatura ambiente, por até três meses.
Ácido acético 5N. Em uma capela de exaustão, adicionar cuidadosamente 286ml (300g) de ácido acético glacial em menos de um litro de água destilada, dissolver e completar o volume para um litro com água destilada.

Reagente B (solução 0,5% de alfa-naftol)

alfa-naftol	1g
Ácido acético (5N) 30%	completar para 200ml

Dissolver o α–naftol em menos de 200ml de ácido acético 5N e completar o volume para 200ml com ácido acético 5N. Estocar em frasco escuro.

Equivalentes comerciais

Reagentes de Nitrato Soluções A e B (LABORCLIN 910199) (reagentes prontos em frascos com 10ml)

SOLUÇÕES DE ÁCIDO CLORÍDRICO

HCl 1N. Dissolver 86ml de ácido clorídrico concentrado em menos de um litro de água destilada e completar o volume para um litro.
HCl 0,1N. Dissolver 8,6ml do ácido clorídrico concentrado em menos de um litro de água destilada e completar o volume para um litro.
HCl 0,02N. Dissolver 20ml do HCl 1N em menos de um litro de água destilada e completar o volume para um litro.

Equivalentes comerciais

Ácido Clorídrico 1N (Laborclin 560247)
Ácido Clorídrico 0,1N (Laborclin 560250)

SOLUÇÃO DE ÁLCOOL IODADO

Aplicação. Desinfetante.

Composição

Iodo	10g
Iodeto de potássio	10g
Etanol 70%	500ml

Preparação. Colocar o iodo e o iodeto de potássio em um almofariz e homogeneizar com o pistilo. Adicionar o álcool em pequenas porções e continuar homogeneizando após cada adição. Em seguida, transferir para um frasco e lavar o almofariz e o pistilo com o restante do álcool, recolhendo o lavado no mesmo frasco.

SOLUÇÃO DE ÁLCOOL IODADO 3:1

Aplicação. Desinfetante recomendado pelo BAM/FDA para a desinfecção de ovos.

Composição

Solução de iodo/iodeto de potássio	250ml
Etanol 70%	750ml

Preparação da solução de iodo/iodeto de potássio. Dissolver100g de iodeto de potássio em 200-300ml de água destilada. Adicionar 50g de iodo e aquecer levemente, com agitação, até a dissolução do iodo. Completar o volume para um litro com água destilada. Estocar em frasco escuro com rolha de vidro, ao abrigo da luz.
Preparo do etanol 70%. Vide etanol 70%.
Preparação da solução de álcool iodado 3:1. Adicionar 250ml da solução de iodo/iodeto de potássio a 750ml de etanol 70% e misturar bem.

SOLUÇÃO DE AZUL BRILHANTE DE COOMASSIE

Aplicação. Usada na confirmação de *B. cereus*, para coloração de cristais de toxinas intracelulares.

Preparação. Dissolver 0,25g de azul brilhante de coomassie em uma mistura de 50ml de etanol absoluto + 7ml de ácido acético glacial + 43ml de água destilada.

SOLUÇÃO 0,04% DE AZUL DE BROMOTIMOL

Aplicação. Usado no teste de fermentação da rafinose e salicina por *C. perfringens.* Usado também para verificar o pH de vidraria de laboratório.

Preparação. Dissolver 0,1g de azul de bromotimol em 16ml de solução 0,01N de NaOH e, em balão volumétrico, completar o volume para 250ml com água destilada.

SOLUÇÃO DE CITRATO DE SÓDIO 2%

Aplicação. Diluente para homogeneização e diluição de amostras de produtos lácteos para a análise.

Composição

Citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	20g
Água destilada	1 litro
pH 7,5±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver o citrato de sódio na água, aquecendo a 45-50°C. Ajustar o pH final em 7,5±0,2. A concentração das soluções NaOH ou HCl utilizadas no ajuste do pH deve ser tal que o volume adicionado não seja superior a 10% do volume de solução de citrato de sódio. Esterilizar a 121°C/15min.

SOLUÇÃO DE CLORETO FÉRRICO 10%

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de fenilalanina desaminase.

Composição

Cloreto férrico ($FeCl_3$)	10g
Água destilada	100ml

Preparacão. Dissolver o cloreto férrico na água destilada. Estocar em frasco escuro, sob refrigeração.

SOLUÇÕES DE CORANTES e INDICADORES DE pH PARA ADIÇÃO EM MEIOS DE CULTURA

Indicadores ácidos. Devem ser preparados dissolvendo-se 0,1g na quantidade de NaOH 0,1N especificada na tabela abaixo. Após a dissolução, a diluição final da solução é feita com água destilada, na quantidade especificada abaixo:

Indicador	pK	pH de viragem	Volume de NaOH 0,1N para dissolver 0,1g	Volume de água para diluição final da solução	Concentração
Azul de bromotimol	7,1	6,1 = amarelo 7,7 = azul	2,5ml	47,5ml	0,2%
Azul de timol	8,9	8,0 = amarelo 9,6 = azul	2,2ml	7,8ml	1%
Púrpura bromocresol	6,2	5,4 = amarelo 7,0 = púrpura	1,9ml	8,1ml	1%
Vermelho de cresol	8,3	7,4 = amarelo 9,0 = vermelho	2,6ml	47,4ml	0,2%
Vermelho de fenol	7,8	6,9 = amarelo 8,5 = vermelho	4ml	46ml	0,2%
Vermelho Neutro	7,5	6,8 = vermelho 8,0 = amarelo	*	*	1%

* No caso do vermelho neutro, dissolver 1g em 100ml de solvente composto de 90% de etanol e 10% de água.

Azul de metileno: solução aquosa, solubilidade 4% em água, 1,5% em etanol.

Azul de toluidina: solução aquosa, solubilidade 3,8% em água, 0,5% em etanol.

Cristal violeta: solução aquosa até 1,5% ou alcoólica, solubilidade 13% em etanol, 1,6% em água.

Eosina amarela: solução aquosa, solubilidade 44% em água, 2% em etanol.

Fucsina básica: solução alcoólica, solubilidade 8% em etanol, 0,4% em água.

Safranina I: solúvel em água e etanol.

Verde brilhante: solúvel em água e etanol.

Verde de malaquita: solução aquosa, solubilidade 3% em água, 2% em etanol.

SOLUÇÃO DE CREATINA

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de Voges-Proskauer.

Composição

Creatina (monohidrato)	0,5g
Água destilada	100ml

Preparação. Dissolver a creatina na água

SOLUÇÃO DE DESOXICOLATO DE SÓDIO 0,5%

Aplicação. Reagente para realização do teste do fio, utilizado na confirmação de *Vibrio cholerae.*

Composição/preparação. Dissolver 0,5g de desoxicolato de sódio em 100ml de água destilada. Não é necessário ajustar o pH e pode ser estocado em frasco de tampa de rosca, à temperatura ambiente.

SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO 2%

Aplicação. Diluente para homogeneização e diluição de amostras de produtos lácteos para a análise.

Composição

Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	20g
Água destilada	1 litro
pH 7,5±0,2 ou 8,4±0,2* - 121ºC/15min	

* O pH final depende do uso, conforme orientação do Capítulo 2.

Preparação. Dissolver o fosfato dipotássico na água, aquecendo a 45-50ºC. Ajustar o pH final em 7,5±0,2 ou 8,4±0,2, dependendo do uso, conforme orientação do Capítulo 2. A concentração das soluções NaOH ou HCl utilizadas no ajuste do pH deve ser tal que o volume adicionado não seja superior a 10% do volume de solução de fosfato dipotássico. Esterilizar a 121ºC/15min.

SOLUÇÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO 2% COM ANTI-ESPUMANTE

Aplicação. Diluente para homogeneização e diluição de amostras de produtos lácteos para a análise.

Composição

Fosfato dipotássico (K_2HPO_4)	20g
Solução anti-espumante (solução aquosa 0,1% de polietilenoglicol 2000)	1ml
Água destilada	1 litro
pH 7,5±0,2 ou 8,4±0,2* - 121ºC/15min	

* O pH final depende do uso, conforme orientação do Capítulo 2.

Preparação. Dissolver o fosfato dipotássico na água, aquecendo a 45-50ºC. Adicionar a solução anti-espumante e ajustar o pH final em 7,5±0,2 ou 8,4±0,2, dependendo do uso, conforme orientação do Capítulo 2. A concentração das soluções NaOH ou HCl utilizadas no ajuste do pH deve ser tal que o volume adicionado não seja superior a 10% do volume de solução de fosfato dipotássico. Esterilizar a 121ºC/15min.

SOLUÇÃO DE FUCSINA BÁSICA 0,5%

Composição

Fucsina básica	0,5g
Etanol 95%	20ml
Água destilada	completar para 100ml

Preparação. Dissolver a fucsina no álcool e completar o volume para 100ml com água destilada. Filtrar em papel de filtro e estocar em frasco escuro.

Equivalentes comerciais

Fucsina básica 0,5% (Laborclin 910081) (frasco com 100ml)

SOLUÇÃO GLICEROL SAL TAMPONADA

Aplicação. Usada para o congelamento de amostras destinadas à contagem de *C. perfringens*, durante o transporte e a estocagem.

Composição

Glicerina (glicerol) PA	100ml
Fosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4)	12,4g
Fosfato monopotássico anidro (KH_2PO_4)	4g
Cloreto de sódio (NaCl)	4,2g
Água destilada	900ml
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver o cloreto de sódio e completar o volume para 900ml com água destilada. Adicionar a glicerina e os sais de fosfato. Ajustar o pH em 7,2 e esterilizar a 121°C/15min. Para preparar a solução em concentração dupla, use 200ml de glicerina e 800ml de água destilada.

SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO SALINA 0,5%

Aplicação. Usada para o tratamento com KOH, na detecção de *Y. enterocolitica*.

Composição

Hidróxido de potássio (KOH)	0,5g
Cloreto de sódio (NaCl)	0,5g
Água destilada	100ml
121°C/15min	

Preparação. Dissolver os sais na água destilada e esterilizar a 121°C/15min. Preparar no dia do uso.

SOLUÇÕES DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO

NaOH 1N. Dissolver 40g de NaOH em menos de um litro de água destilada e completar o volume para um litro.

NaOH 0,1N. Dissolver 4g de NaOH em menos de um litro de água destilada e completar o volume para um litro.

NaOH 0,02N. Dissolver 0,8g de NaOH em menos de um litro de água destilada e completar o volume para um litro.

Equivalentes comerciais

Solução de hidróxido de sódio 1N (Laborclin 560261)
Solução de hidróxido de sódio 0,1N (Laborclin 560263)
Solução de hidróxido de sódio 0,01N (Laborclin 905269)

SOLUÇÃO DE HIPURATO DE SÓDIO

Aplicação. Usada no teste de hidrólise do hipurato, para identificação de espécies de *Campylobacter*.

Composição

Hipurato de sódio	10g
Cloreto de sódio	8,5g
Fosfato dissódico dihidratado ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	8,98g
Fosfato monossódico monohidratado ($NaH_2PO_4.H_2O$)	2,71g
Água destilada	Completar para 1000ml
Esterilizar por filtração	

Preparação. Dissolver os ingredientes na água destilada e esterilizar por filtração. Distribuir asséticamente porções de 0,4ml em tubos estéreis e estocar sob congelamento (20°C negativos).

SOLUÇÃO DE NINIDRINA

Aplicação. Usada no teste de hidrólise do hipurato, para identificação de espécies de *Campylobacter*.
Composição

Ninidrina	1,75g
Acetona	25ml
Butanol	25ml

Preparação. Dissolver a ninidrina na mistura acetona/butanol e estocar sob refrigeração em frasco escuro e/ou ao abrigo da luz, por até uma semana.

SOLUÇÃO DE RINGER ¼ DE CONCENTRAÇÃO

Aplicação. Diluente para preparação de amostras.
Composição

Cloreto de sódio (NaCl)	2,25g
Cloreto de potássio (KCl)	0,105g
Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)	0,12g
Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$)	0,05g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 - 121°C/15min	

Preparação. Dissolver os componentes e esterilizar a 121°C/15min.

Equivalentes comerciais

Ringer's Solution ¼ Strength em tabletes (Oxoid BR52)
Ringer's Tablets (Merck 1.15525)

SOLUÇÃO DE SAFRANINA 05%

Aplicação. Corante, usado como contra corante na coloração de esporos e no teste confirmatório rápido de Holbrook & Anderson (para *B. cereus*).

Composição

Safranina O	0,5g
Água destilada	100ml

SOLUÇÃO SALINA 0,85%

Aplicação. Usada na preparação de esfregaços para coloração, nos testes de aglutinação com anti-soros em lâminas e outras finalidades.

Composição

Cloreto de sódio (NaCl)	8,5g
Água destilada	1 litro
121ºC/15min	

SOLUÇÃO DE SUDAN BLACK 0,3%

Aplicação. Corante, usado no teste confirmatório rápido de Holbrook & Anderson para *B. cereus.*

Composição

Sudan Black B	0,3g
Etanol 70%	100ml

Preparação. Dissolver 0,3g do corante em 100ml de etanol 70%. Após a dissolução da maior parte do corante, agitar periodicamente durante o dia e deixar descansar uma noite. Se necessário, filtrar para remover o excesso de corante não dissolvido. Estocar em frasco bem fechado.

FORMALINA
SOLUÇÃO SALINA FORMALINIZADA

Aplicação. Reagente para prova sorológica, sorologia flagelar para *Salmonella.*

Composição

Formaldeído(solução 36-38%)	0,6ml
Cloreto de sódio	0,85g
Água destilada	100ml

Preparação. Preparar 100ml de solução salina 0,85% e esterilizar a 121ºC/15min. Resfriar à temperatura ambiente e adicionar o formaldeído à solução salina estéril, assepticamente. Não autoclavar nem aquecer após a adição do formaldeído.

SOLUÇÃO DE SULFATO FERROSO AMONIACAL 1%

Aplicação. Reagente para teste de pirazinamidade, usado na confirmação de *Y. enterocolitica.*

Composição

Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$]	1,38g
Água destilada	100ml

Preparação. Dissolver o sal na água, preparar no momento do uso.

SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO 10%

Aplicação. Usado para neutralização do cloro em amostras de água.

Composição

Tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)	15,7g
Água destilada	100ml
121ºC/15min	

SOLUÇÃO DE TRIPOLIFOSFATO 2%

Aplicação. Diluente para homogeneização e diluição de amostras de caseína com problemas de solubilidade.

Composição

Tripolifosfato ($Na_3O_{10}P_3$)	20g
Água destilada	1 litro
121ºC/20min	

Preparação. Dissolver o tripolifosfato na água destilada, aquecendo se necessário. Esterilizar a 121°C/20min e manter sob refrigeração (0-5°C) por até um mês.

SOLUÇÕES DE VERDE BRILHANTE 1% e 0,1%

Aplicação. Corante usado como agente seletivo em meios de cultura para *Salmonella*.

Preparação. Dissolver 1g ou 0,1g de verde brilhante em 100ml de água destilada e esterilizar por filtração. Estocar em frasco escuro, sob refrigeração. Antes de colocar em uso, testar com uma cepa padrão de *Salmonella*, se não apresenta efeito tóxico nos meios de cultura onde são adicionadas.

SOLUÇÃO DE VERDE MALAQUITA (AQUOSA 5%)
(vide reagentes para coloração de esporos)

SOLUÇÃO DE VERMELHO DE METILA PARA TESTE DE VM

Aplicação. Reagente para prova bioquímica, teste de vermelho de metila.

Composição

Vermelho de metila	0,1g
Etanol 95%	300ml
Água destilada	completar para 500ml

Preparação. Dissolver o vermelho de metila no etanol e completar o volume para com água destilada. Estocar em frasco escuro, sob refrigeração.

PB
TAMPÃO FOSFATO pH 7,2
(Tampão Butterfield)
(Água de Diluição Fosfato)

Aplicação. Diluente para homogeneização e diluição de amostras para a análise, dissolução de antibióticos e outras aplicações.

Solução Estoque

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	34g
Água destilada	completar para 1 litro depois de ajustar o pH
pH 7,2±0,2 - 121ºC/15min	

Dissolver o fosfato monopotássico em 500ml de água e ajustar o pH em 7,2 com NaOH 1N (aproximadamente 175ml). Completar o volume para 1 litro com água destilada e esterilizar a 121ºC/15min. Estocar em geladeira.

Solução tampãode uso (Butterfield)

Solução estoque	1,25ml
Água destilada	completar para 1 litro
121ºC/15min	

TAMPÃO FOSFATO COM CLORETO DE MAGNÉSIO
(Água de Diluição)
(Água de Diluição Fosfato Magnésio)

Aplicação. Diluente para amostras de água.

Composição

Tampão Fosfato pH 7,2 - solução estoque	1,25ml
Solução de cloreto de magnésio (81,1g de $MgCl_2.6H_2O$ em 1 litro água)	5,00ml
Água destilada	completar para 1 litro
121ºC/15min	

PBS
TAMPÃO FOSFATO SALINA

Aplicação. Diluente para a análise de *Vibrio* sp.

Composição

Cloreto de sódio (NaCl)	7,650g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4) anidro	0,724g
Fosfato monopotássico(KH_2PO_4)	0,210g
Água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 - 121ºC/15min	

Preparação. Dissolver os ingredientes na água destilada e ajustar o pH em 7,4±0,2 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N. Autoclavar a 121ºC/15min.

TAMPÃO FOSFATO SALINA 0,02M PARA TESTE DE LISOSTAFINA

Aplicação. Usado no teste de sensibilidade à lisostafina para confirmação de *S. aureus*.

Solução estoque 1

Fosfato dissódico (Na_2HPO_4) anidro	28,4g
Cloreto de sódio (NaCl)	85g
Água destilada	1 litro

Solução estoque 2

Fosfato monossódico monohidratado ($NaH_2PO_4.H_2O$)	27,6g
Cloreto de sódio (NaCl)	85g
Água destilada	1 litro

Preparação. Diluir 1:10 a solução estoque 1, volume final 500ml (50ml da solução estoque 1 em 450ml de água destilada). Diluir 1:10 a solução estoque 2, volume final 100ml (10ml da solução estoque 2 em 90ml de água destilada). Usando o pHmetro, titular a solução diluída 1 com a solução diluída 2, até o pH chegar a 7,3-7,4 (adição de aproximadamente 65ml da solução diluída 2 à solução diluída 1). A solução resultante é o tampão fosfato salina 0,02M para ser usado no teste de sensibilidade à lisostafina.

VASPAR

Aplicação. Material para selar a superfície de caldos de cultura, para cultivo em condições anaeróbias.

Composição

Vaselina	100g
Parafina	100g
121ºC/15min	

Preparação. Pesar a vaselina e a parafina em um becker e aquecer até a completa fusão. Distribuir em Erlenmeyers ou tubos e esterilizar a 121ºC/30min.

REFERÊNCIAS

BAM/FDA, 2009A. Media Index for BAM. In: *Bacteriological Analytical Manual Online*, Food and Drug Administration,. Disponível no site <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacteriological Analytical ManualBAM/ucm055778.htm>. Acesso em 23/02/2010.

BAM/FDA, 2009B. Reagents Index for BAM. In: *Bacteriological Analytical Manual Online*, Food and Drug Administration,. Disponível no site <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacteriological AnalyticalManualBAM/ucm055791.htm>. Acesso em 23/02/2010.

DOWNES, F. P. & ITO, K (eds.). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed.* Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 63, p.601-648.

EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W. & GREENBERG, A.E. (Eds). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater, 21st Ed.* Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA & Water Environment Federation (WEF), 2005. Part 9000, p.9.1-9.169.

HORWITZ, W. & LATIMER, G.W. (eds.), 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Ed.* AOAC International, Gaithersburg, Maryland.

IFU 12/2007. *Method on the detection of taint producing Alicyclobacillus in fruit juices.* International Federation of Fruit Juice Producers, 2004, revised 2007.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs - *Horizontal method for the detection of Salmonella spp., 4th Ed.* The International Organization for Standardization, 2002.

ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: *General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions, 1st Ed.* The International Organization for Standardization, 1999.

ISO 6887-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: *Specific rules for the preparation of meat and meat products, 1st Ed.* The International Organization for Standardization, 2003.

ISO 6887-3. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: *Specific rules for the preparation of fish and fishery products, 1st Ed.* The International Organization for Standardization, 2003.

ISO 6887-4. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: *Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, and fish and fishery products, 1st Ed.* The International Organization for Standardization, 2003.

ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs - G*eneral requirements and guidance for microbiological examination, 3rd Ed.* The International Organization for Standardization, 2007.

ISO 8261/IDF 122. *Milk and milk products - General guidance for the preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination 2nd Ed.* The International Organization for Standardization, 2001.

ISO 10272-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs - *Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter - Part 1: Detection Method, 1th Ed.* The International Organization for Standardization, 2006.

ISO 10272-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs - *Horizontal method for the detection and enumeration of Campylobacter, - Part 2: Colony Count Technique, 1th Ed.* The International Organization for Standardization, 2006.

ISO/TS 22964:2006(E). *Milk and milk products - Detection of Enterobacter sakazakii.* The International Organization for Standardization, 2006.

MLG/FSIS/USDA, 2008. Media and Reagents. In: *Microbiological Laboratory Guidebook Online*, Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture. Disponível no site <http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_Appendix_1_03.pdf>. Acesso em 23/02/2010.

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. (eds). *Fungi and Food Spoilage, 3rd Ed.* Springer, London, 2009. Media Appendix, p. 423-426.

WEHR, H.M. & FRANK, J.F (Eds.). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th Ed.* American Public Health Association, Washington, D. C., 2004.

ANEXO 2A

Resolução RDC Nº 12 de 2 de janeiro de 2001
(D.O.U de 10/01/01 Seção 1 p. 45 a 53)

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária no uso da atribuição que lhe confere o art. 11, inciso IV do Regulamento da ANVISA, aprovado pelo Decreto 3029 de 16 de abril de 1999, em reunião realizada em 20 de dezembro de 2000,

considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos;

considerando a definição de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, indispensáveis para a avaliação das Boas Práticas de Produção de Alimentos e Prestação de Serviços, da aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC/HACCP) e da qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, incluindo a elucidação de Doença Transmitida por Alimentos(DTA)

considerando a importância de compatibilizar a legislação nacional com regulamentos harmonizados no Mercosul, relacionados aos critérios e padrões microbiológicos para alimentos - Resoluções Mercosul GMC nº 59/93, 69/93, 70/93, 71/93, 82/93, 15/94, 16/94, 43/94, 63/94, 78/94, 79/94, 29/96, 30/96, 31/96, 32/96, 42/96, 78/96, 81/96, 82/96, 83/96, 134/96, 136/96, 137/96, 138/96, 145/96, 01/97 e 47/97)

adotou a seguinte Resolução e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ALIMENTOS, em Anexo.

Art. 2º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 4º Fica revogada a Portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997, publicada no DOU de 2 de julho de 1998.

GONZALO VECINA NETO

ANEXO DA RDC 12/01
REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE OS PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ALIMENTOS

1. ALCANCE

1.1. Objetivo

Estabelecer os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos especificados no Anexo I e determinar os critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano especificados no Anexo II.

1.2. Âmbito de aplicação

Este Regulamento se aplica aos alimentos destinados ao consumo humano.

Excluem-se deste Regulamento os produtos alimentícios e as toxinas de origem microbiana, como as micotoxinas, para os quais existem padrões definidos em legislação especifica.

Excluem-se também matérias-primas alimentares e os produtos semi-elaborados, destinados ao processamento industrial desde que identificados com os seguintes dizeres: "inadequados para o consumo humano na forma como se apresentam" ou "não destinados para o consumo humano na forma como se apresentam".

2. CRITÉRIOS PARA O ESTABELECIMENTO DE PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS EM ALIMENTOS.

Os critérios para estabelecimento de padrão microbiológico podem ser considerados isoladamente ou em conjunto conforme a seguir:

2.1.Caracterização dos microrganismos e ou suas toxinas considerados de interesse sanitário.
2.2.Classificação dos alimentos segundo o risco epidemiológico.
2.3.Métodos de análise que permitam a determinação dos microrganismos
2.4.Plano de Amostragem para a determinação do número e tamanho de unidades de amostras a serem analisadas.
2.5.Normas e padrões de organismos internacionalmente reconhecidos, Codex Alimentarius e outros organismos.

Outros critérios, quando evidências científicas o justifiquem.

3. DEFINIÇÕES

Para efeito deste regulamento adota-se as seguintes definições:

3.1. DTA: Doença Transmitida por Alimento, causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico.
3.2. Amostra indicativa: é a amostra composta por um número de unidades amostrais inferior ao estabelecido em plano amostral constante na legislação específica.
3.3.Amostra representativa: é a amostra constituída por um determinado número de unidades amostrais estabelecido de acordo com o plano de amostragem.

3.4.Matéria-prima alimentar: toda substância de origem vegetal ou animal, em estado bruto que, para ser utilizada como alimento, precise sofrer tratamento e/ou transformação de natureza física, química ou biológica.
3.5.Produto semi-elaborado: são aqueles produtos que serão submetidos a outras etapas de processamento industrial, que não impliquem em transformação de sua natureza.
3.6.Alimentos comercialmente estéreis: alimentos processados em embalagens herméticas, estáveis à temperatura ambiente.
3.7.Unidade amostral: porção ou embalagem individual que se analisará, tomado de forma totalmente aleatória de uma partida, como parte da amostra geral.

4. REFERÊNCIAS

4.1. BRASIL. Decreto-Lei nº 986, de 12/10/69. Institui Normas Básicas sobre Alimentos.

4.2. BRASIL. Lei nº 6437, de 24 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá providências.

4.3. BRASIL. Portaria nº1428, de 26/11/93. Aprova Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos e Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade para Serviços e Produtos na Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de dezembro de 1993. Seção 1, pt.1.

4.4. BRASIL. Portaria SVS/MS nº 326, de 30/07/1997. Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 01 de agosto de 1997. Seção 1, pt.1.

4.5. Codex Alimentarius Commission - Principles for the establishment and application of microbiogical criteria for foods CAC/GL 21 -1997

5. PROCEDIMENTOS E INSTRUÇÕES GERAIS

5.1. As metodologias para amostragem, colheita, acondicionamento, transporte e para análise microbiológica de amostras de produtos alimentícios devem obedecer ao disposto pelo Codex Alimentarius; "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (I.C.M.S.F.); "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" e "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" da American Public Health Association (APHA)"; "Bacteriological Analytical Manual" da Food and Drug Administration , editado por Association of Official Analytical Chemists (FDA/AOAC), em suas últimas edições e ou revisões, assim como outras metodologias internacionalmente reconhecidas.
5.1.1. Caso sejam utilizados outros métodos laboratoriais, ou suas modificações, que não estejam referendados nos dispostos indicados no item 5.1., os mesmos devem ser validados por estudos comparativos intra e inter laboratoriais, que certifiquem que os resultados obtidos por seu uso sejam equivalentes aos das metodologias citadas. Os registros dos processos de validação das metodologias também devem estar disponíveis, sempre que necessário, e devem cumprir com os expostos em 5.1.
5.2. Deve-se proceder a colheita de amostras dos alimentos em suas embalagens originais não violadas, observando a quantidade mínima de 200g ou 200mL por unidade amostral. Quando se tratar de produtos a granel, ou de porções não embaladas na origem, deve-se cumprir as Boas

Práticas de Colheita constantes nas referências do item 5.1., respeitando-se a quantidade mínima necessária. Aceitam-se exceções para os casos relacionados a elucidação de DTA, e de rastreamento de microrganismos patogênicos. No caso de investigação de DTA, devem ser colhidas as sobras dos alimentos efetivamente consumidos pelo(s) afetado(s).

5.2.1. No caso de alimentos comercialmente estéreis, cada unidade da amostra indicativa deve ser composta de no mínimo 3 (três) unidades do mesmo lote, para fins analíticos. Da mesma forma, quando se tratar da aplicação do plano de amostragem estatística, deve-se efetuar a colheita de, no mínimo, 3 conjuntos de unidades amostrais.

5.3. Dispensa-se a colheita da amostra sempre que o produto estiver alterado e ou deteriorado. Entende-se por produto alterado ou deteriorado o que apresenta alteração(ões) e ou deterioração(ões) físicas, químicas e ou organolépticas, em decorrência da ação de microrganismo e ou por reações químicas e ou físicas.

5.3.1.Nestes casos, as intervenções legais e penalidades cabíveis não dependem das análises e de laudos laboratoriais. Excetuam-se os casos em que a amostra estiver implicada em casos de DTA, para rastreamento de microrganismos patogênicos ou toxinas.

5.4. As amostras colhidas para fins de análise de controle e fiscal devem atender aos procedimentos administrativos estabelecidos em legislação específica.

5.5. A amostra deve ser enviada ao laboratório devidamente identificada e em condições adequadas para análise, especificando as seguintes informações: a data, a hora da colheita, a temperatura (quando pertinente) no momento da colheita e transporte, o motivo da colheita, a finalidade e o tipo de análise, as condições da mesma no ponto da colheita e outros dados que possam auxiliar as atividades analíticas.

5.5.1. Na emissão do laudo analítico, a conclusão e interpretação dos resultados das análises microbiológicas devem seguir o disposto no Anexo II.

5.6. No laboratório, a amostra é submetida à inspeção para avaliar se apresenta condições para a realização da análise microbiológica. Nas seguintes situações, a análise não deve ser realizada, expedindo-se laudo referente à condição da amostra:

a) quando os dados que acompanham a amostra revelarem que a mesma, no ponto de colheita, se encontrava em condições inadequadas de conservação ou acondicionamento;

b) quando a amostra embalada apresentar sinais de violação;

c) quando a amostra não embalada na origem tiver sido colhida e ou acondicionada e ou transportada em condições inadequadas;

d) quando a amostra apresentar alterações ou deterioração visível;

e) quando a identificação da amostra não cumprir com o disposto no item 5.5. destes Procedimentos e Instruções Gerais.

5.6.1.Exceções são aceitas quando a amostra estiver implicada em casos de DTA, para rastreamento de microrganismos patogênicos ou toxina. A amostra deve vir acompanhada de relatório adicional com informações que permitam direcionar a determinação analítica pertinente.

5.7. Para fins analíticos, os padrões microbiológicos descritos no Anexo I deste Regulamento referem se aos resultados de análise de alíquotas obtidas da amostra, de acordo com as referências que constam do item 5.1 deste Regulamento.

5.8. Planos de amostragem

5.8.1. Para fins de aplicação de plano de amostragem entende-se:

a) m: é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável.

b) M: é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis

c) n: é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos nos quais o padrão estabelecido é ausência em 25g, como para *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* e outros patógenos, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo).

d) c: é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classes.

5.8.2. Tipos de plano

a) Duas classes: quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável ou inaceitável, em função do limite designado por M, aplicável para limites qualitativos.

b) Três classes: quando a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável, qualidade intermediária aceitável ou inaceitavél, em função dos limites m e M. Além de um número máximo aceitável de unidades de amostra com contagem entre os limites m e M, designado por c. As demais unidades, n menos c, devem apresentar valores menores ou iguais a m. Nenhuma das unidades n pode apresentar valores superiores ao M.

5.8.3. Situações de aplicação dos planos de amostragem:

5.8.3.1. Para os produtos relacionados no Anexo I do presente Regulamento no caso de avaliação de lotes e ou partidas, adotam-se os planos estatísticos mínimos (planos de três classes), conforme constam no referido Anexo.

5.8.3.2. Nos casos onde o plano estatístico mencionado no item anterior não conferir a proteção desejada, devidamente justificada, pode-se recorrer a complementação de amostra, conforme as referências indicadas no item 5.1. destes Procedimentos.

5.8.3.3. Quando nos pontos de venda ou de qualquer forma de exposição ao consumo, o lote ou partida do produto alimentício estiver fracionado ou de alguma forma não disponível na sua totalidade ou quando o número total de unidades do lote for igual ou inferior a 100 (cem) unidades, ou ainda, o produto estiver a granel, pode-se dispensar a amostragem estatística e proceder a colheita de uma amostra indicativa, aplicando-se o plano de duas classes.

5.8.3.4. Quando da existência do plano de duas classes onde o c igual a zero, o resultado positivo de uma amostra indicativa é interpretado para todo o lote ou partida. O mesmo se aplica quando for detectada a presença de toxinas em quantidades suficientes para causar doença no consumidor.

5.9. Considerações sobre os grupos de microrganismos pesquisados

5.9.1. A denominação de "coliformes a 45ºC" é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes". Caso seja determinada a presença de *Escherichia coli*, deve constar no laudo analítico.

5.9.2. A determinação de clostrídio sulfito redutor a 46^0C tem por objetivo a indicação de *Clostridium perfringens*. Caso seja determinada a presença de *C.perfringens*, deve constar o resultado no laudo analítico. Este critério consta como "C.sulfito redutor a 46^0C" no Anexo I do presente Regulamento.

Nota: No que se refere à metodologia para clostrídios sulfito redutores a 46^0C, adotam-se os meios de cultura para isolamento de *Clostridium perfringens* dos textos constantes no item 3.1. destes Procedimentos. São caracterizados por bactérias do grupo clostrídio sulfito redutor as que

apresentarem desenvolvimento de colônias sulfito redutoras a 46^{0}C por 24 horas; anaeróbios; bastonetes Gram positivos.
5.9.3. A enumeração de estafilococos coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*. A determinação da capacidade de produção de termonuclease e quando necessário, a de toxina estafilocócica das cepas isoladas podem ser realizadas a fim de se obter dados de interesse da saúde pública. Este critério consta como "Estaf.coag.positiva" no Anexo I do presente Regulamento.
5.9.4. A determinação de *Pseudomonas aeruginosa* consta como *P.aeruginosa* nos padrões específicos constantes no Anexo I.
5.9.5. A determinação de *Vibrio parahaemolyticus* consta como *V. parahaemolyticus* nos padrões específicos constantes no Anexo I.
5.9.6. Quando os resultados forem obtidos por contagem em placa, estes devem ser expressos em UFC/ g ou mL (Unidades Formadoras de Colônias por grama ou mililitro). Da mesma forma, devem indicar NMP/ g ou mL (Número Mais Provável por grama ou mililitro), quando forem obtidos por esta metodologia.
5.9.7. Nos padrões constantes no Anexo I, a abreviatura "aus" significa "ausência". A abreviatura "pres" significa "presença". O símbolo "<" significa "menor que".
5.9.8. O resultado da determinação de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* deve ser expresso como Presença ou Ausência na alíquota analisada. No Anexo I, estes microrganismos constam, respectivamente, como *Salmonella* sp e *L. monocytogenes*.
5.9.9. Quando da elucidação de DTA, os resultados devem especificar o número de células viáveis do microrganismo agente da doença, conforme informações e metodologias constantes nas referências citadas no item 5.1. destes Procedimentos. Os valores estabelecidos para os padrões microbiológicos de cada grupo de alimento constantes no Anexo I não se aplicam para o diagnostico de caso/surto de DTA.
5.9.10. Em situações de risco epidemiológico que justifique um ALERTA SANITÁRIO, podem ser realizadas outras determinações não incluídas nos padrões estabelecidos, em função do problema ou aplicado plano de amostragem mais rígido conforme I.C.M.S.F.

ANEXO I DA RDC 12/01
PADRÕES MICROBIOLÓGICOS SANITÁRIOS PARA ALIMENTOS

1. A tolerância é máxima e os padrões são mínimos para os diferentes grupos de produtos alimentícios, constantes no presente anexo, para fins de registro e fiscalização de produtos alimentícios. Estes limites e critérios podem ser complementados quando do estabelecimento de programas de vigilância e rastreamento de microrganismos patogênicos e de qualidade higiênica e sanitária de produtos (consultar Princípios e Procedimentos Gerais e os Anexos II).
2. No caso de análise de produtos não caracterizados nas tabelas especificadas neste Anexo, considera-se a similaridade da natureza e do processamento do produto, como base para seu enquadramento nos padrões estabelecidos para um produto similar, constante no referido Anexo I deste Regulamento.

GRUPO 1. FRUTAS, PRODUTOS DE FRUTAS E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) morangos frescos e similares, "in natura", inteiras, selecionadas ou não.	Coliformes a 45ºC/g	$2x10^3$	5	2	$2x10^2$	$2x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto.	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) branqueadas ou cozidas, inteiras ou picadas, estáveis a temperatura ambiente, refrigeradas ou congeladas, consumidas diretamente; passa, com ou sem adição de açúcar ou mel; desidratadas, secas(excluídas as passas), liofilizadas, com ou sem adição de açúcar ou mel, incluindo as cristalizadas ou glaceadas e similares); polpa de frutas concentradas ou não, com ou sem tratamento térmico, refrigeradas ou congeladas	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) nozes, amêndoas, amendoim e similares, cruas, inteiras ou descascadas	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
e) purês e doces em pasta ou massa e similares, incluindo geleias, não comercialmente estéreis; doces em calda, não comercialmente estéreis (a granel)	Bolores e Leveduras/g	10^4	5	2	10^3	10^4
GRUPO 2. HORTALIÇAS, LEGUMES E SIMILARES, INCLUINDO COGUMELOS (FUNGOS COMESTÍVEIS)	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) frescas, "in natura", inteiras, selecionadas ou não, com exceção de cogumelos.	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto, com exceção de cogumelos.	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) cogumelos (fungos comestíveis) "in natura"	Coliformes a 45ºC/g	$2x10^3$	5	2	$5x10^2$	$2x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) branqueadas ou cozidas, inteiras ou picadas, estáveis a temperatura, refrigeradas ou congeladas ambiente, consumidas diretamente, incluindo cogumelos; polpas ou purês, refrigerados ou congelados	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
e) branqueadas ou cozidas, inteiras ou picadas, , consumidas diretamente, incluindo cogumelos	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) secas, desidratadas ou liofilizadas, incluindo cogumelos	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 3. RAÍZES, TUBÉRCULOS E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto.	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) branqueadas ou cozidas, inteiras ou picadas, estáveis a temperatura ambiente, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g	$5x10^3$	5	2	$5x10^2$	$5x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) secas, desidratadas ou liofilizadas	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B. cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) polpa ou purês, refrigeradas ou congeladas	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	B. cereus/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

GRUPO 4. OUTROS PRODUTOS VEGETAIS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) semi conservas de vegetais em embalagens herméticas, que necessitam refrigeração (azeitonas, fundo de alcachofra, fungos comestíveis e similares)	Coliformes a 45ºC	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) vegetais em salmoura, temperados ou não, condimentados ou não, não comercialmente estéreis (tremoço, azeitona recheada, fundos de alcachofra e similares), estáveis à temperatura ambiente, a granel ou em embalagem plastificada flexível (sacos plásticos)	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) pasta de amendoim, de nozes, castanhas e similares, com adições (temperos, açúcar, etc.) ou não; outras conservas de vegetais, em óleo, salmoura ou outros líquidos, não comercialmente estéreis, estáveis à temperatura ambiente	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2		10
GRUPO 5. CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) carnes resfriadas, ou congeladas, "in natura", de bovinos, suínos e outros mamíferos (carcaças inteiras ou fracionadas, quartos ou cortes); carnes moídas; miúdos de bovinos, suínos e outros mamíferos	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) carnes resfriadas, ou congeladas, "in natura", de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes)	Coliformes a 45ºC/g	10^4	5	3	$5x10^3$	10^4
c) miúdos de aves	Coliformes a 45ºC/g	10^5	5	3	10^4	10^5
d) carnes cruas preparadas de aves, refrigeradas ou congeladas, temperadas	Coliformes a 45ºC/g	10^4	5	3	10^3	10^4
e) carnes cruas preparadas, bovinas, suínas e de outros mamíferos, refrigeradas ou congeladas, temperadas	Coliformes a 45ºC/g	10^4	5	2	$5x10^3$	10^4
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (hamburgueres, almôndegas, quibe e similares); produtos a base de sangue e derivados "in natura"; embutidos frescais (lingüiças cruas e similares)	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^3$	5	3	$5x10^2$	$5x10^3$
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Clost. sulfito redutor a $46^0C/g$	$3x10^3$	5	2	$5x10^2$	$3x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
g) carnes embaladas a vácuo, maturadas	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^3$	5	3	$5x10^2$	$5x10^3$
	Estaf.coag.positiva/g	$3x10^3$	5	2	$5x10^2$	$3x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
h) carnes embaladas a vácuo, não maturadas	Coliformes a 45ºC/g	10^4	5	2	10^3	10^4
	Estaf.coag.positiva/g	$3x10^3$	5	2	$5x10^2$	$3x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
i) produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcela e outros); produtos a base de sangue e derivados, processados	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Estaf.coag.positiva/g	$3x10^3$	5	1	10^2	$3x10^3$
	C. sulfito redutor a 46^0C	$5x10^2$	5	1	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
j) produtos cárneos cozidos ou não, maturados ou não, fracionados ou fatiados, mantidos sob refrigeração	Coliformes a 45ºC/g	10^5	5	2	10^2	10^3
	C. sulfito redutor a 46^0C	$5x10^2$	5	1	10^2	$5x10^2$
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^3$	5	1	10^3	$5x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
l) produtos cárneos maturados (presuntos crus, copas, salames, lingüiças dessecadas, charque, "jerked beef" e similares)	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^3$	5	1	10^3	$5x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
m) semi conservas em embalagens herméticas mantidas sob refrigeração (patês, galantines e similares)	Coliformes a 45ºC /g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	1	10^2	$5x10^2$
	C. sulfito redutor a 46^0C	$5x10^2$	5	1	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
n) produtos cárneos salgados (lombo, pés, rabo, orelhas e similares, carne seca e similares)	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	1	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
o) gorduras e produtos gordurosos de origem animal (toucinho, banha, peles, bacon e similares)	Estaf.coag.positiva/g	$3x10^3$	5	1	$5x10^2$	$3x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
p) gordura animal hidrogenada e parcialmente hidrogenada, exceção de manteiga	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

GRUPO 6. OVOS E DERIVADOS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) ovo íntegro cru	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) gema, clara ou suas misturas, pasteurizadas, resfriadas ou congeladas, com ou sem açúcar, sal e outros aditivos	Coliformes a 45ºC /mL	1	5	2		1
	Estaf.coag.positiva/mL	5x10	5	1	10	5x10
	Salmonella sp/25mL	Aus	5	0	Aus	-
c) gema, clara ou suas misturas em pó(desidratados, liofilizados), com ou sem açúcar, sal e outros ingredientes ou aditivos.	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	1	10
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	1	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) semi conservas em embalagens herméticas mantidas sob refrigeração (ovos cozidos conservados em salmoura ou outros líquidos)	Coliformes a 45ºC/g	10	5	1	1	10
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 7. PESCADOS E PRODUTOS DE PESCA	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) pescado, ovas de peixes, crustáceos e moluscos cefalópodes "in natura", resfriados ou congelados não consumido cru; moluscos bivalves "in natura", resfriados ou congelados, não consumido cru; carne de rãs "in natura", refrigerada ou congelada	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) moluscos bivalves, carne de siri e similares cozidos, temperados e não, industrializados resfriados ou congelados	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) pescados, moluscos e crustáceos secos e ou salgados; semi conservas de pescados, moluscos e crustáceos, mantidas sob refrigeração (marinados, anchovados ou temperados)	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	3	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) pescado defumado, moluscos e crustáceos, refrigerados ou congelados; produtos derivados de pescado (surimi e similares), refrigerados ou congelados	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
e) produtos à base de pescado refrigerados ou congelados (hamburgueres e similares)	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	3	10^2	10^3
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) ovas de pescados processadas, refrigeradas ou congeladas	Coliformes a 45 ºC /g	10^2	5	3	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
g) pescados pré cozidos, empanados ou não, refrigerados ou congelados	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 8. LEITE DE BOVINOS E DE OUTROS MAMÍFEROS E DERIVADOS						
8.A. LEITE PASTEURIZADO E PRODUTOS A BASE DE LEITE UAT (UHT)	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) Leite pasteurizado	Coliformes a 45ºC/mL	4	5	1	2	4
	Salmonella sp/25mL	Aus	5	0	Aus	-
b) leite UAT (UHT) e produtos a base de leite UAT/UHT (creme de leite, bebidas lácteas fermentadas e não, e similares), em embalagens herméticas	Após 7 dias de incubação a 35-37ºC de embalagem fechada	não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento.				

8.B. QUEIJOS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) de baixa umidade: <36% (parmesão, reggianto, sbrinz e similares, exceção dos queijos ralados e em pó)	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Estaf.coag.positiva./g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) de média umidade: 36% < umidade < 46% (danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarela (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Estaf.coag.positiva./g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
	L.monocytogenes/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) quartirolo, cremoso, criollo, mussarela (mozzarella, muzzarella) e similares: 46% < umidade < 55% exceção de minas frescal e incluído o queijo de coalho com umidade correspondente	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
	L.monocytogenes/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) de alta umidade: 46% < umidade < 55%, exceção dos queijos quartirolo, cremoso, criollo e de coalho; de muito alta umidade: umid 55%, com bactérias lácticas abundantes e viáveis, incluído o Minas frescal correspondente	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
	L.monocytogenes/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) de muito alta umidade: umid 55%, incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, minas frescal, mussarela (mozzarella, muzzarella) e outros, elaborados por coagulação enzimática, sem a ação de bactérias lácticas	Coliformes a 45ºC	$5x10^2$	5	2	5x10	$5x10^2$
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	1	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
	L.monocytogenes/25g	Aus	5	0	Aus	-
h) ralado	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
i) em pó	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2		10
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	1	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
j) processado fundido, pasteurizado ou submetido a processo UHT (UAT), incluindo requeijão, aromatizado ou não, condimentados ou não, adicionados de ervas ou outros ingredientes ou não; processado fundido, ralado, fatiado, em rodelas, em fatias, para untar, aromatizado ou não, condimentado ou não, adicionado de ervas ou outros ingredientes ou não	Coliformes a $45^{oC/g}$	10	5	2		10
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
m) queijos de baixa ou média umidade, temperados, condimentados ou adicionado de ervas ou outros ingredientes	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
n) queijos de muito alta umidade, temperados, condimentados ou adicionado de ervas ou outros ingredientes	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

8.C. MANTEIGA, CREME DE LEITE E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) Manteiga; Gordura láctea (gordura anidra de leite ou butter-oil); creme de leite pasteurizado	Coliformes a $45^{oC/g}$	10	5	2	<3	10
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	1	10	10^2
	Salmonella sp /25g	Aus	5	0	Aus	-

8.D. LEITE EM PÓ	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) leite em pó, instantâneo e não, exceção dos destinados à alimentação infantil e formulações farmacêuticas	Bacillus cereus/g	$5x10^3$	5	2	$5x10^2$	$5x10^3$
	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	<3	10
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	1	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	10	0	Aus	-

8.E. DOCE DE LEITE	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) Doce de leite, com ou sem adições, exceto os acondicionados em embalagem hermética ou a granel	Colifiormes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/ 25g	Aus	5	0	Aus	-
8.F. LEITE FERMENTADO	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) leite fermentado, com ou sem adições, refrigerado, e com bactérias lácticas viáveis nos números mínimos.	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	<3	10
b) bebida láctea fermentada, refrigerada, com ou sem adições	Coliformes a 45ºC/mL	10	5	2	<3	10
	Salmonella sp/25mL	Aus	5	2	Aus	-
8.G. OUTROS PRODUTOS LÁCTEOS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) pasta ou molho de base láctea pasteurizada, refrigerada, com ou sem adições, temperadas ou não, excluindo os queijos	B.cereus/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Coliformes a 45^0C/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) sobremesas lácteas pasturizadas refrigeradas, com ou sem adições	B.cereus/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Coliformes a 45 ºC /g	5	5	2	3	5
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) mistura (pó) para o preparo de bebidas de base láctea, que serão consumidas após emprego de calor ou não	B. cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2		10
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	1	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	10	0	Aus	-
d) leite geleificado, pasteurizado com ou sem adições	Coliformes a 45ºC/g	5	5	2	1	5
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 9. ALIMENTOS PROCESSADOS EM EMBALAGENS HERMÉTICAS, ESTÁVEIS A TEMPERATURA AMBIENTE, EXCEÇÃO LEITE E DERIVADOS UAT (UHT)	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) alimentos com baixa acidez (pH maior que 4,5); alimentos com alta acidez (pH menor ou igual a 4,5); alimentos com atividade de água intermediária (0,80 ≤ aw ≤ 0,86) *Não devem existir sinais de alteração das embalagens, nem quaisquer modificações físicas, químicas ou organolépticas do produto, que evidenciem deterioração e não podem revelar variação de pH maior que 0,2. Quando necessário será verificada a esterilidade comercial conforme metodologia específica.	Ver item 5.2.1. dos Procedimentos Gerais	-	-	-	-	-
	Após 10 dias de incubação a 35-37ºC, de embalagem fechada	sem alteração*	5	0	sem alteração*	
	Após 5 dias de incubação a 55ºC, de embalagem fechada:	sem alteração*			sem alteração*	
GRUPO 10. FARINHAS, MASSAS ALIMENTÍCIAS, PRODUTOS PARA E DE PANIFICAÇÃO, (INDUSTRIALIZADOS E EMBALADOS) E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados	B.cereus/g	$3x10^3$	5	2	10^2	$3x10^3$
	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) massas alimentícias secas, com ou sem ovos, com ou sem recheio; massas alimentícias frescas, cruas e não fermentadas, com ou sem ovos, com ou sem recheio e cobertura, e similares, refrigeradas	B.cereus/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	3	5x10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) produtos semi elaborados, com ou sem recheio, com ou sem cobertura (pão de queijo, de batata e similares, pizza, pastéis), refrigerados e similares	B.cereus/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Estaf. coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) pão sem recheio e sem cobertura e produtos de panificação (roscas, farinha de rosca, torradas e pão tipo sueco, com ou sem sabores) e similares	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	3	5x10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

Continuação

e) panetones, pães de Páscoa, bolos, massa pronta para tortas e similares, prontos para uso ou consumo, estáveis à temperatura ambiente	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	5	10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) bolachas e biscoitos, sem recheio, com ou sem cobertura, incluindo pão de mel, cookies e similares	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	5	10
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
g) bolachas e biscoitos, com recheio, com ou sem cobertura, incluindo pão de mel, cookies, alfajores e similares	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
h) mistura em pó com ou sem ovos para bolos, pães, tortas, empadas, pizzas e similares	B.cereus/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
i) cereais matinais, extrudados	Coliformes a 45ºC/g	1	5	2		1
j) produtos a base de amidos, farinhas, féculas e fubá, semi elaborados, estáveis à temperatura ambiente	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
l) farelo e fibras de cereais, com ou sem mistura de farinhas, de outros produtos de cereais, com ou sem adições de outros ingredientes e similares	B.cereus/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus.	-
m) cereais compactados, em barra ou outras formas, com ou sem adições	B.cereus/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
n) granola e mistura de cereais não compactados, com ou sem adições, e similares	B. cereus/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 11. AÇÚCARES, ADOÇANTES E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) açúcar refinado, sólido (moído, em grânulos e similares) ou líquido	Coliformes a 45ºC/g (mL)	5	5	2		5
b) açúcar cristal não refinado, açúcar mascavo e demerara, melado, melaço e rapadura e similares	Coliformes a 45ºC/g (mL)	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
c) edulcorantes, adoçantes de mesa e similares, em pó, líquido ou comprimidos	Coliformes a 35ºC/g(mL)	2	5	1		2
GRUPO 12. PRODUTOS A SEREM CONSUMIDOS APÓS ADIÇÃO DE LÍQUIDO, COM EMPREGO DE CALOR (MIN. 75ºC DURANTE 20 SEGUNDOS), EXCLUINDO OS DE BASE LÁCTEA E DE CHOCOLATE (CACAU E SIMILARES)	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) café torrado, em grão, moído e solúvel, descafeinado e não, adicionado de outros ingredientes e não (com sabores, café capuccino), cevada em pó e similares	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	5	10
b) chá e produtos similares, não obtidos por processamento térmico (secos, desidratados ou não), consumidos após tratamento térmico (infusão e decocção), com ou sem adição de açúcar e outros ingredientes	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) chá e produtos similares, obtidos por processamento térmico (torração e processos similares), consumidos após tratamento térmico (Infusão e decocção), com ou sem adição de açúcar e outros ingredientes	Coliformes a 45ºC/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) misturas ou pós para preparo de sopas, caldos, purês, risotos, massas alimentícias e outras preparações para empanar, temperar, e similares	B.cereus/g	$3x10^3$	5	2	10^3	$3x10^3$
	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
e) misturas ou pós para preparo de sobremesas, excluindo gelatinas	B.cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) pós, flocos, folhas, misturas em pó para preparo de sobremesas à base de gelatina e similares	Coliformes a 45ºC/g	1	5	2		1

GRUPO 13. PRODUTOS A SEREM CONSUMIDOS APÓS ADIÇÃO DE LÍQUIDO, SEM EMPREGO DE CALOR, EXCLUINDO OS DE BASE LÁCTEA	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) mistura (pó) para o preparo de bebidas excluindo pó para o preparo de bebidas não alcoólicas, especificado no item 17 deste Anexo	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	5	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) mistura (pó) para o preparo de outros alimentos instantâneos	B.cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	5	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 14. PRODUTOS SÓLIDOS PRONTOS PARA O CONSUMO (PETISCOS E SIMILARES)	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) sementes comestíveis cruas, salgadas, condimentadas ou não	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Salmonella sp/25g	aus	5	0	aus	-
b) sementes comestíveis torradas, fritas, salgadas, adocicadas, condimentadas ou não, com coberturas e não.	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	5	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) produtos salgados e doces, extrudados ou não, fritos, assados ou compactados, incluindo torresmos e similares	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	1	5	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 15. ESPECIARIAS, TEMPEROS, CONDIMENTOS E MOLHOS PREPARADOS E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) especiarias íntegras e moídas (grãos, folhas, raízes, ou outras partes do vegetal), isolados ou em mistura, colorífico e similares	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) especiarias, condimentos e temperos prensados ou flocados ou em pó com adição de outros ingredientes ou não	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) temperos em pasta ou molho, isolados ou em mistura, com ou sem especiarias (pasta e molho de alho ou cebola, molhos para saladas, e outros)	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) condimentos e produtos para o preparo de molhos prensados, flocados ou em pó(mistura para tempero de feijão, refogar e similares)	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2		10
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
e) molhos e condimentos preparados, líquidos ou cremosos, prontos para o consumo, não comercialmente estéreis (tempero de saladas e outros alimentos), excluindo ketchup, mostarda e maionese	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) ketchup e mostarda de mesa, não comercialmente estéreis, prontos para o consumo, isolados ou em mistura, adicionados ou não de outros ingredientes	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2		10
g) maionese e similares, industrializados, incluindo molhos e pastas à base de maionese, com ou sem outros ingredientes	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2		10
	Salmonella sp/25g	aus	5	0	aus	-
h) outros produtos para temperar (glutamato monosódico e similares), prontos para o consumo	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	5	10
	Salmonella sp/25g	aus	5	0	aus	-
GRUPO 16. MARGARINA, AZEITE VIRGEM, GORDURAS E CREMES VEGETAIS E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) margarina, cremes vegetais e similares, em mistura e não com manteiga ou outras gorduras animais	Coliformes a 45ºC/g	1	5	3		1
b) gordura vegetal hidrogenada ou parcialmente hidrogenada, incluindo os produtos para untar e similares	Coliformes a 45ºC/g	5	5	2	1	5
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	2	5x10	10^2
c) azeite de dendê e similares	Coliformes a 45ºC/g	5	5	2	1	5
GRUPO 17. SUCOS, REFRESCOS, REFRIGERANTES E OUTRAS BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS, EXCLUINDO OS DE BASE LÁCTEA E DE CHOCOLATE (CACAU E SIMILARES)	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) refrigerantes e outros compostos líquidos prontos para o consumo; refrescos, sucos e néctares adicionados ou não de conservadores, congelados ou não	Coliformes a 35ºC/ 50mL	Aus	5	0	Aus	-
b) sucos concentrados adicionados ou não de conservadores, congelados ou não. Obs. Valores estabelecidos para o produto reconstituído	Coliformes a 35ºC/50mL	Aus	5	0	Aus	-
	Salmonella sp/25mL	Aus	5	0	Aus	-
e) sucos desidratados, incluindo caldo de cana, de açaí e similares	Coliformes a 35ºC/g	10	5	2	1	10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

Continuação

f) xaropes e preparado líquido para refrescos	Coliformes a 35ºC/g	10	5	2	1	10
g) pó para o preparo de refrescos	Coliformes a 35ºC/g	1	5	2		1
h) sucos e refrescos "in natura", incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares, isolados ou em misturas	Coliformes a 45ºC/mL	10^2	5	3	10	10^2
	Salmonella sp/25 mL	Aus	5	0	Aus	-
i) sucos pasteurizados e refrigerados, incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares, isolados ou em mistura	Coliformes a 45ºC/mL	10	5	3	5	10
	Salmonella sp/25 mL	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 18. PRODUTOS DE CONFEITARIA, LANCHONETE, PADARIAS E SIMILARES, DOCES E SALGADOS - PRONTOS PARA CONSUMO	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) bolos, tortas e similares, doces ou salgados, com ou sem recheio e cobertura, estáveis a temperatura ambiente; pastéis, empadas, sanduíches quentes e outros salgados	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Clostrídios sulfito redutores a 46^0C/g (para produtos à base de carnes)	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) bolos, tortas e similares, doces ou salgados, com ou sem recheio e cobertura, refrigerados ou congelados	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Clostrídios sulfito redutores a 46^0C/g (para produtos à base de carnes)	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	aus	5	0	aus	-
c) sanduíches frios e similares	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	B.cereus/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Clostrídios sulfito redutores a 46^0C/g (para produtos à base de carnes)	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	aus	-
d) pães doce e salgado, com recheio e ou com cobertura e similares	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^3$	5	2	$5x10^2$	$5x10^3$
	B.cereus/g	$5x10^3$	5	2	$5x10^2$	$5x10^3$
	Clostrídios sulfito redutores a 46^0C/g (para produtos à base de carnes)	$5x10^3$	5	2	$5x10^2$	$5x10^3$
	Salmonella sp/25g	aus	5	0	aus	-
GRUPO 19. CHOCOLATES, BALAS, PRODUTOS PARA CONFEITARIA, GOMAS DE MASCAR E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) balas, pastilhas, drageados, caramelos, confeitos e similares	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	1	10
	Salmonella sp/25g (exclusivo para drageados)	Aus	5	0	Aus	-
b) gomas de mascar e similares	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	1	10
c) chocolate e produtos similares em barra ou na forma de bombom, adicionado ou não de outros ingredientes secos	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	1	10
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) chocolate e produtos similares, em barra, bombom e similares, com ou sem recheio e cobertura, excluindo os que contém ingredientes secos	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	5	10
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
e) chocolates e produtos similares, em pó, granulado ou flocados e outros produtos de cacau e similares	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^3$	5	3	10^3	$5x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) caldas, xaropes, cremes, recheios e similares, exceção dos acondicionadas em embalagens herméticas	Coliformes a 45ºC/g	1	5	2	1	10
g) coberturas em pó, granuladas ou flocadas, prontas para consumo, incluindo as farofas doces	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

Continuação

h) cremes, recheios e similares, refrigerados ou congelados	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 20. ALIMENTOS EMBALADOS E CONGELADOS, EXCEÇÃO DE SOBREMESAS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) alimentos parcialmente preparados (massas alimentícias cruas com ou sem recheio, pratos crus à base de carnes, vegetais, pescados, cereais, etc.)	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g (específico para produtos à base de cereais ou amidos)	$5x10^3$	5	2	$2x10^2$	$5x10^3$
	Clostrídios sulfito redutores a 46ºC/g (para produtos à base de carnes)	$3x10^2$	5	2	$2x10^2$	$3x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) pães, pizzas e outras massas parcialmente preparadas, condimentadas ou não, adicionada de outros ingredientes ou não e similares, incluindo os pães de queijo	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	B.cereus/g	$5x10^3$	5	2	10^3	$5x10^3$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) alimentos preparados, que necessitam de descongelamento e aquecimento, mas não de cocção, segundo instruções da rotulagem	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g (específico para produtos à base de cereais ou amidos)	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Clostrídios sulfito redutores a 46ºC/g (para produtos à base de carnes)	$5x10^2$	5	2	$2x10^2$	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 21. GELADOS COMESTÍVEIS E PRODUTOS PARA O PREPARO DE GELADOS COMESTÍVEIS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) gelados comestíveis e produtos especiais gelados a base de leite e produtos lácteos (sorvetes e picolés com ou sem cobertura, sanduíche e bolo de sorvete) e similares; Preparados e concentrados para o preparo de gelados comestíveis	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) gelados comestíveis e produtos especiais gelados, de base não láctea (água, suco de fruta) e similares	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) base, em pó ou líquida, para o preparo de gelados comestíveis	Coliformes a 45ºC/g(mL)	10	5	2	5	10
	Salmonella sp/25g (mL) (específico para os que contém ovos)	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 22. PRATOS PRONTOS PARA O CONSUMO (ALIMENTOS PRONTOS DE COZINHAS, RESTAURANTES E SIMILARES)	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) a base de carnes, pescados, ovos e similares cozidos	Coliformes a 45ºC/g	2x10	5	2	10	2x10
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Clostrídios sulfito redutores a 46ºC/g (para produtos à base de carnes)	10^3	5	2	$2x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

Continuação

b) a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.)	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^3$	5	3	10^2	$5x10^3$
	V.parahaemolyticus(p/ produtos base de pescados)	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) sopas, caldos e molhos cozidos	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	1	10
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Clostrídios sulfito redutores a 46ºC/g (para produtos à base de carnes)	10^3	5	2	10^2	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) a base de cereais, farinhas, grãos e similares; saladas mistas, temperadas ou não, com ou sem molho, exceção das adicionadas de molho de maionese e similares	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
d) a base de verduras e legumes crus, temperados ou não, em molho ou não	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
e) a base de verduras, legumes, raízes, tubérculos e similares, cozidos, temperados ou não	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
f) saladas adicionadas de molho de maionese e similares	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
h) doces e sobremesas tipo caseiro, não industrializados, excluídas as frutas frescas não manipuladas	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g (específico para produtos à base de cereais ou amidos)	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
i) pastas preparadas para canapés e sanduíches	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	B.cereus/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Clostrídios sulfito redutores a 46ºC/g (para produtos à base de carnes)	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 23. LEITE DE COCO E COCO RALADO	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) leite de coco desidratado ou não, desengordurado ou não, compactado ou não	Coliformes a 45ºC/g(mL)	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf. coag. positiva/g(mL)	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
b) coco ralado "in natura"	Coliformes a 45ºC/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Estaf.coag.positiva/g	10^3	5	2	$5x10^2$	10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) coco ralado desidratado, laminado, flocado, adoçado ou não, torrado ou não, desengordurado ou não e similares	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 24. PRODUTOS A BASE DE SOJA	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) bebida a base de extrato de soja, aromatizada ou não, desengordurada ou não, refrigerada e similares; extrato desidratado e proteína texturizada de soja, desengordurado ou não e similares	Coliformes a 45ºC/mL	10	5	2	5	10
	B.cereus/mL	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25mL	Aus	5	0	Aus	-

Continuação

b) tofu e similares, desengordurado ou não	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	5x10^3	5	2	5x10^2	5x10^3
	B.cereus/g	5x10^3	5	2	5x10^2	5x10^3
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
c) pasta de soja fermentada (missô) e similares, desengordurada ou não	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	10	10^2
	Estaf.coag.positiva/g	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 25. ALIMENTOS INFANTIS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) produtos prontos ou instantâneos que serão consumidos após adição de líquidos, por crianças acima de 1 ano de idade, incluindo os alimentos de transição e de seguimento, exceção dos produtos comercialmente estéreis	Coliformes a 35^0C/g (mL)	20	5	2	3	20
	Coliformes a 45ºC/g (mL)	1	5	1		1
	Estaf.coag.positiva/g(mL)	5x10	5	2	10	5x10
	B.cereus/g (mL)	5x10^2	5	2	10^2	5x10^2
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	10	0	aus	-
b) produtos prontos ou instantâneos que serão consumidos com ou sem adição de líquidos, por bebês de até 1 ano de idade, a exceção dos prematuros, incluindo as fórmulas infantis, exceto os que receberam tratamento térmico em embalagens herméticas	Coliformes a 35ºC/g(mL)	10	5	2		10
	Coliformes a 45ºC/g	Aus	5	0	Aus	-
	Estaf.coag.positiva/g(mL)	Aus	5	0	Aus	-
	B.cereus/g (mL)	10^2	5	1	10	10^2
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	10	0	Aus	-
c) fórmulas infantis para prematuros, exceto os que receberam tratamento térmico em embalagens herméticas	Coliformes a 35^0C/g (mL)	10	5	1		10
	Coliformes a 45ºC/g	Aus	5	0	Aus	-
	Estaf.coag.positiva/g(mL)	Aus	5	0	Aus	-
	B.cereus/g (mL)	5x10	5	1	10	5x10
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	10	0	Aus	-
d) leite materno de bancos de leite	Aeróbios mesófilos viáveis/mL	10^2	5	1	10	10^2
	Coliformes a 35^0C/mL	Aus	5	0	Aus	-
	Estaf.coag.positiva/mL	Aus	5	0	Aus	-
	Salmonella sp/25mL	Aus	5	0	Aus	-
e) água envasada para o preparo de mamadeiras e similares	Aeróbios mesófilos viáveis/mL	5x10^2	5	1	10^2	5x10^2
	Coliformes a 35^0C/100mL	Aus	5	0	Aus	-
	P.aeruginosa/100mL	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 26. ALIMENTOS PARA GRUPOS POPULACIONAIS ESPECÍFICOS, INCLUINDO AS DIETAS ENTERAIS E EXCLUINDO OS ALIMENTOS INFANTIS	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) alimentos para gestantes e nutrizes, excluídos os que serão consumidos após adição de líquidos, com emprego de calor	Coliformes a 45ºC	Aus	5	0	Aus	-
	Estaf.coag.positiva/g	5x10	5	2	10	5x10
	B.cereus/g	5x10^2	5	1	10^2	5x10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	10	0	Aus	-
b) alimentos para imunosuprimidos e imunocomprometidos, excluídos os que serão consumidos após adição de líquidos, com emprego de calor	Coliformes a 45ºC	Aus	5	0	Aus	-
	Estaf.coag.positiva/g	10	5	1		10
	B.cereus/g	5x10^2	5	1	5x10	5x10^2
	Salmonella sp/25g	Aus	10	0	Aus	-
	Bolores e leveduras/g	5x10	5	1	10	5x10
c) dietas enterais, em pó e módulos de nutrientes em pó para composição de dieta enteral	Aeróbios mesófilos viáveis/mL	10^3	5	2	5x10^2	10^3
	Coliformes a 35^0C/g	3	5	1		3
	Estaf.coag.positiva/g	5x10	5	1	10	5x10
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-

Continuação

d) dietas enterais líquidas, em embalagens herméticas, estáveis à temperatura ambiente *Não devem existir sinais de alteração das embalagens, nem quaisquer modificações físicas, químicas ou organolépticas do produto, que evidenciem deterioração e não podem revelar variação de pH maior que 0,2. Quando necessário será verificada a esterilidade comercial conforme metodologia específica.	Ver item 5.2.1. dos Procedimentos Gerais	-	-	-	-	-
	Após 10 dias de incubação a 35-37ºC, de embalagem fechada	sem alteração*	5	0	sem alteração*	
	Após 5 dias de incubação a 55ºC, de embalagem fechada:	sem alteração*			sem alteração*	
e) água envasada para o preparo de alimentos para imunosuprimidos e imunocomprometidos e para dietas enterais	Aeróbios mesófilos viáveis/mL	$5x10^2$	5	1	10^2	$5x10^2$
	Coliformes a 35ºC/mL	Aus	5	0	Aus	-
	P.aeruginosa/mL	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 27. SUPLEMENTOS VITAMÍNICO E MINERAIS E SIMILARES, EM FORMA DE PÓ, CÁPSULAS, DRÁGEAS E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) suplementos alimentares (vitaminas, sais minerais, extrato de leveduras e similares, isolados ou em mistura) em pó, cápsulas, drágeas e similares	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	5	10
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	B.cereus/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
b) óleo em cápsula ou outras formas (alho, copaíba, fígado de bacalhau), incluindo preparações com geléia real, isolados ou em misturas e similares	Coliformes a 45ºC/g	5	5	2		5
c) outros produtos em pó, cápsulas, drágeas e similares, como gelatina, guaraná, catuaba, marapuama, lecitina e outros, isolados ou em mistura	Coliformes a 45ºC/g	10	5	2	5	10
	Estaf.coag.positiva/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g	Aus	5	0	Aus	-
GRUPO 28. ADITIVOS INTENCIONAIS, COADJUVANTES DE TECNOLOGI A E SIMILARES	Microrganismo	Tolerância p/ amostra indicativa	Tolerância para Amostra Representativa			
			n	c	m	M
a) corantes à base de sangue e derivados	Coliformes a 45ºC/g (mL)	10	5	2	5	10
	Estaf.coag.positiva/g(mL)	10^2	5	2	10	10^2
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
b) outros aditivos de origem biológica (colchonilha e similares), excluindo fermentos biológicos, enzimas, coalhos e similares	Coliformes a 45ºC/g (mL)	10	5	2	5	10
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
d) fermento biológico em pó para panificação	Coliformes a 45ºC/g	5x10	5	2	10	5x10
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
e) outros fermentos biológicos para panificação;	Coliformes a 45ºC/g	10^2	5	2	5x10	10^2
-fermentos biológicos para produtos lácteos, cárneos e similares	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
f) fermentos químicos; coalho em pó	Aer.meso.viáveis/g	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
g) coalho líquido	Coliformes a 45ºC/mL	5	5	1	1	5
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
h) outros produtos à base de enzimas, não enquadrados em d), e) e g)	Coliformes a 45ºC/g (mL)	5x10	5	2	10^2	5x10
	Estaf.coag.positiva/g(mL)	$5x10^2$	5	2	10^2	$5x10^2$
	Salmonella sp/25g (mL)	Aus	5	0	Aus	-
i) outros aditivos e coadjuvantes com exceção dos corantes	Salmonella sp/ 25g ou mL	Aus	5	0	Aus	-
j) outros corantes	Salmonella sp/ 25g ou mL	Aus	5	0	Aus	-
l) aditivos e coadjuvantes, dispersos em diluentes ou outros suportes	Devem cumprir com os padrões estabelecidos para o suporte específico					

ANEXO II DA RDC 12/01
CONCLUSÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ALIMENTOS DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO

1. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Para interpretação dos resultados, compara-se os valores encontrados nas análises realizadas com os valores estabelecidos no Anexo I. De acordo com essa comparação, temos:

1.1. Produtos em condições sanitárias satisfatórias
São aqueles cujos resultados analíticos estão abaixo ou igual aos estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa, conforme especificado no Anexo I do presente Regulamento.
1.2. Produtos em condições sanitárias insatisfatórias
1.2.1. São aqueles cujos resultados analíticos estão acima dos limites estabelecidos para amostra indicativa ou amostra representativa, conforme especificado no Anexo I do presente Regulamento.
1.2.2. São aqueles cujos resultados analíticos demonstram a presença ou a quantificação de outros microrganismos patogênicos ou toxinas que representem risco à saúde do consumidor.

2. CONCLUSÃO

2.1. "PRODUTO OU LOTE (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) DE ACORDO COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES" para as situações enquadradas no item 1.1 do Anexo II deste Regulamento.
2.2."PRODUTO OU LOTE (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) IMPRÓPRIO PARA O CONSUMO HUMANO POR APRESENTAR ..." (citar o(s) resultado(s) analítico(s) e o(s) parâmetro(s) não atendido(s) do Anexo I) para as situações enquadradas no item 1.2.1. do Anexo II deste Regulamento.
2.3."PRODUTO OU LOTE (se amostra indicativa ou representativa, respectivamente) IMPRÓPRIO PARA O CONSUMO HUMANO POR APRESENTAR (microrganismo patogênico ou toxina que representa perigo severo a saúde do consumidor).

ANEXO 2B

Resolução RDC Nº 275 de setembro de 2005
(D.O.U de 23/09/05)

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o art. 11 inciso IV do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto 3.029, de 16 de abril de 1999, c/c do Art. 111, inciso I, alínea "b" § 1º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº. 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, em reunião realizada em 29, de agosto de 2005,

considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população;

considerando a necessidade de atualização da legislação sanitária de alimentos, com base no enfoque da avaliação de risco e da prevenção do dano à saúde da população;

considerando que os regulamentos técnicos da ANVISA de padrões de identidade e qualidade de alimentos devem priorizar os parâmetros sanitários;

considerando que o foco da ação de vigilância sanitária é a inspeção do processo de produção visando a qualidade do produto final;

adota a seguinte Resolução de Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Aprovar o "REGULAMENTO TÉCNICO DE CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PARA ÁGUA MINERAL NATURAL E ÁGUA NATURAL", constante do Anexo desta Resolução.

Art. 2º O descumprimento aos termos desta Resolução constitui infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades previstas na Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU RAPOSO DE MELLO

ANEXO DA RDC 275/05
REGULAMENTO TÉCNICO DE CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PARA ÁGUA MINERAL NATURAL E ÁGUA NATURAL

1. ALCANCE

Fixar as características microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural.

2. DEFINIÇÃO

2.1. Amostra indicativa: é a amostra composta por um número de unidades amostrais inferior ao estabelecido para a amostra representativa.
2.2. Amostra representativa: é a amostra constituída por um número de unidades amostrais estabelecido na Tabela 1.
2.3. Unidade amostral: porção ou embalagem(ns) individual(is) tomadas para ensaio, de forma aleatória de uma partida do produto.

3. PROCEDIMENTOS E INSTRUÇÕES GERAIS

A Água Mineral Natural e a Água Natural envasadas não devem apresentar risco à saúde do consumidor e devem estar em conformidade com as características microbiológicas descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural.

Microrganismo	Amostra indicativa limites	Amostra representativa			
		n	c	m	M
Escherichia coli ou coliformes (fecais) termotolerantes em 100ml	ausência	5	0	-	ausência
Coliformes totais em 100ml	<1UFC ou <1,1NMP ou ausência	5	1	<1UFC ou <1,1NMP ou ausência	2UFC ou 2,2NMP
Enterococos em 100ml	<1UFC ou <1,1NMP ou ausência	5	1	<1UFC ou <1,1NMP ou ausência	2UFC ou 2,2NMP
Pseudomonas aeruginosa em 100ml	<1UFC ou <1,1NMP ou ausência	5	1	<1UFC ou <1,1NMP ou ausência	2UFC ou 2,2NMP
Clostrídios sulfito redutores ou *Clostridium perfringens* em 100ml	<1UFC ou <1,1NMP ou ausência	5	1	<1UFC ou <1,1NMP ou ausência	2UFC ou 2,2NMP

n: é o número de unidades da amostra representativa a serem coletadas e analisadas individualmente.
c: é o número aceitável de unidades da amostra representativa que pode apresentar resultado entre os valores "m" e "M".
m: é o limite inferior (mínimo) aceitável. É o valor que separa qualidade satisfatória de qualidade marginal do produto. Valores abaixo do limite "m" são desejáveis.
M: é o limite superior (máximo) aceitável. Valores acima de "M" não são aceitos.

3.1. Amostra indicativa

3.1.1. A amostra é condenada (rejeitada) quando for constatada a presença de *Escherichia coli* ou coliformes (fecais) termotolerantes ou quando o número de coliformes totais e ou enterococos e

ou *Pseudomonas aeruginosa* e ou clostrídios sulfito redutores ou *Clostridium perfringens* for maior que o limite estabelecido para amostra indicativa.

3.1.2. Deve ser efetuada a análise da amostra representativa quando na amostra indicativa for detectada a presença de *Escherichia coli* ou coliformes (fecais) termotolerantes e ou o número de coliformes totais e ou enterococos e ou *Pseudomonas aeruginosa* e ou clostrídios sulfito redutores e ou *Clostridium perfringens* for maior que o limite estabelecido para amostra indicativa.

3.2. Amostra representativa

3.2.1. Sempre que se tratar de avaliação de partida deve ser coletada a amostra representativa, em cumprimento aos dispositivos legais vigentes. Excetuam-se as atividades que requeiram amostragem para investigação (relacionada com suspeita ou com identificação de problemas na partida, para confirmação ou verificação da sua natureza e extensão ou ainda para informações sobre as possíveis fontes de problema) ou que requeiram inspeções rígidas (planos estatísticos com maior poder de discriminação de falhas).

3.2.2. A análise das unidades da amostra representativa deve ser feita usando-se o mesmo volume recomendado para a amostra indicativa. Na caracterização microbiológica do produto ou da partida examinada devem ser considerados os resultados da amostra representativa.

3.2.3. A partida é aprovada quando atender os seguintes requisitos:

a) ausência de *Escherichia coli* ou coliformes (fecais) termotolerantes em todas as unidades da amostra representativa;

b) nenhuma unidade da amostra representativa apresentar contagem de coliformes totais, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa*, clostrídios sulfito redutores ou *Clostridium perfringens* maior que "M"; e

c) no máximo uma unidade da amostra representativa apresentar contagem de coliformes totais, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e clostrídios sulfito redutores e ou *Clostridium perfringens* entre os valores "m" e "M".

3.2.4. A partida será rejeitada, quando:

a) for constatada a presença de *Escherichia coli* ou coliformes (fecais) termotolerantes em uma das unidades da amostra representativa; ou

b) apresentar contagem de coliformes totais e ou enterococos e ou *Pseudomonas aeruginosa* e ou clostrídios sulfito redutores e ou *Clostridium perfringens* em uma das unidades da amostra representativa, maior que "M"; ou

c) apresentar contagem de coliformes totais e ou enterococos e ou *Pseudomonas aeruginosa* e ou clostrídios sulfito redutores e ou *Clostridium perfringens* em mais de uma unidade da amostra representativa, maior que "m".

ANEXO 2C

Portaria Nº 518 do Ministério da Saúde de 25 de março de 2004 Controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade (D.O.U de 26/03/04)

O MINISTRO DE ESTADO DA SAÚDE, no uso de suas atribuições e considerando o disposto no Art. 2º do Decreto nº 79.367, de 9 de março de 1977, RESOLVE:

Art. 1º Aprovar a Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano, na forma do Anexo desta Portaria, de uso obrigatório em todo território nacional.

Art. 2º Fica estabelecido o prazo máximo de 12 meses, contados a partir da publicação desta Portaria, para que as instituições ou órgãos aos quais esta Norma se aplica, promovam as adequações necessárias a seu cumprimento, no que se refere ao tratamento por filtração de água para consumo humano suprida por manancial superficial e distribuída por meio de canalização e da obrigação do monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas.

Art. 3º É de responsabilidade da União, dos Estados, dos Municípios e do Distrito Federal a adoção das medidas necessárias para o fiel cumprimento desta Portaria.

Art. 4º O Ministério da Saúde promoverá, por intermédio da Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS, a revisão da Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano estabelecida nesta Portaria, no prazo de 5 anos ou a qualquer tempo, mediante solicitação devidamente justificada de órgãos governamentais ou não governamentais de reconhecida capacidade técnica nos setores objeto desta regulamentação.

Art. 5º Fica delegada competência ao Secretário de Vigilância em Saúde para editar, quando necessário, normas regulamentadoras desta Portaria.

Art. 6º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

HUMBERTO COSTA

cap anexos-2-3.p65 595 11/4/2010, 18:53

ANEXO DA PORTARIA N.º 518 DE 25 DE MARÇO DE 2004
NORMA DE QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

CAPÍTULO I. DAS DISPOSIÇÕES PRELIMINARES

Art. 1º Esta Norma dispõe sobre procedimentos e responsabilidades inerentes ao controle e à vigilância da qualidade da água para consumo humano, estabelece seu padrão de potabilidade e dá outras providências.

Art. 2º Toda a água destinada ao consumo humano deve obedecer ao padrão de potabilidade e está sujeita à vigilância da qualidade da água.

Art. 3º Esta Norma não se aplica às águas envasadas e a outras, cujos usos e padrões de qualidade são estabelecidos em legislação específica.

CAPÍTULO II. DAS DEFINIÇÕES

Art. 4º Para os fins a que se destina esta Norma, são adotadas as seguintes definições:
I. água potável - água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde;
II. sistema de abastecimento de água para consumo humano - instalação composta por conjunto de obras civis, materiais e equipamentos, destinada à produção e à distribuição canalizada de água potável para populações, sob a responsabilidade do poder público, mesmo que administrada em regime de concessão ou permissão;
III. solução alternativa de abastecimento de água para consumo humano - toda modalidade de abastecimento coletivo de água distinta do sistema de abastecimento de água, incluindo, entre outras, fonte, poço comunitário, distribuição por veículo transportador, instalações condominiais horizontal e vertical;
IV. controle da qualidade da água para consumo humano - conjunto de atividades exercidas de forma contínua pelo(s) responsável(is) pela operação de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, destinadas a verificar se a água fornecida à população é potável, assegurando a manutenção desta condição;
V. vigilância da qualidade da água para consumo humano - conjunto de ações adotadas continuamente pela autoridade de saúde pública, para verificar se a água consumida pela população atende à esta Norma e para avaliar os riscos que os sistemas e as soluções alternativas de abastecimento de água representam para a saúde humana;
VI. coliformes totais (bactérias do grupo coliforme) β-bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos, que fermentam a lactose com produção de ácido e gás a $35 \pm 0{,}5\,^{o}C$ em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β-galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo;
VII. coliformes termotolerantes - subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose a $44{,}5 \pm 0{,}2^{o}C$ em 24 horas; tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal;

VIII. *Escherichia coli* - bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a 44,5 ± 0,2°C em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidroliza a uréia e apresenta atividade das enzimas β-galactosidase e β-glucoronidase, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos;
IX. contagem de bactérias heterotróficas - determinação da densidade de bactérias que são capazes de produzir unidades formadoras de colônias (UFC), na presença de compostos orgânicos contidos em meio de cultura apropriada, sob condições pré-estabelecidas de incubação: 35 ± 0,5°C por 48 horas;
X. cianobactérias - microorganismos procarióticos autotróficos, também denominados como cianofíceas (algas azuis), capazes de ocorrer em qualquer manancial superficial, especialmente naqueles com elevados níveis de nutrientes (nitrogênio e fósforo), podendo produzir toxinas com efeitos adversos à saúde; e
XI. cianotoxinas - toxinas produzidas por cianobactérias que apresentam efeitos adversos à saúde por ingestão oral, incluindo:

a) microcistinas - hepatotoxinas heptapeptídicas cíclicas produzidas por cianobactérias, com efeito potente de inibição de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2A e promotoras de tumores;

b) cilindrospermopsina - alcalóide guanidínico cíclico produzido por cianobactérias, inibidor de síntese protéica, predominantemente hepatotóxico, apresentando também efeitos citotóxicos nos rins, baço, coração e outros órgãos; e

c) saxitoxinas - grupo de alcalóides carbamatos neurotóxicos produzido por cianobactérias, não sulfatados (saxitoxinas) ou sulfatados (goniautoxinas e C-toxinas) e derivados decarbamil, apresentando efeitos de inibição da condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio.

CAPÍTULO III. DOS DEVERES E DAS RESPONSABILIDADES

Seção I. Do Nível Federal

Art. 5º São deveres e obrigações do Ministério da Saúde, por intermédio da Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS:
I. promover e acompanhar a vigilância da qualidade da água, em articulação com as Secretarias de Saúde dos Estados e do Distrito Federal e com os responsáveis pelo controle de qualidade da água, nos termos da legislação que regulamenta o SUS;
II. estabelecer as referências laboratoriais nacionais e regionais, para dar suporte às ações de maior complexidade na vigilância da qualidade da água para consumo humano;
III. aprovar e registrar as metodologias não contempladas nas referências citadas no artigo 17 deste Anexo;
III. definir diretrizes específicas para o estabelecimento de um plano de amostragem a ser implementado pelos Estados, Distrito Federal ou Municípios, no exercício das atividades de vigilância da qualidade da água, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS; e
IV. executar ações de vigilância da qualidade da água, de forma complementar, em caráter excepcional, quando constatada, tecnicamente, insuficiência da ação estadual, nos termos da regulamentação do SUS.

Seção II. Do Nível Estadual e Distrito Federal

Art. 6º São deveres e obrigações das Secretarias de Saúde dos Estados e do Distrito Federal:

I. promover e acompanhar a vigilância da qualidade da água em sua área de competência, em articulação com o nível municipal e os responsáveis pelo controle de qualidade da água, nos termos da legislação que regulamenta o SUS;

II. garantir, nas atividades de vigilância da qualidade da água, a implementação de um plano de amostragem pelos municípios, observadas as diretrizes específicas a serem elaboradas pela SVS/MS;

III. estabelecer as referências laboratoriais estaduais e do Distrito Federal para dar suporte às ações de vigilância da qualidade da água para consumo humano; e

IV. executar ações de vigilância da qualidade da água, de forma complementar, em caráter excepcional, quando constatada, tecnicamente, insuficiência da ação municipal, nos termos da regulamentação do SUS.

Seção III. Do Nível Municipal

Art. 7º São deveres e obrigações das Secretarias Municipais de Saúde:

I. exercer a vigilância da qualidade da água em sua área de competência, em articulação com os responsáveis pelo controle de qualidade da água, de acordo com as diretrizes do SUS;

II. sistematizar e interpretar os dados gerados pelo responsável pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, assim como, pelos órgãos ambientais e gestores de recursos hídricos, em relação às características da água nos mananciais, sob a perspectiva da vulnerabilidade do abastecimento de água quanto aos riscos à saúde da população;

III. estabelecer as referências laboratoriais municipais para dar suporte às ações de vigilância da qualidade da água para consumo humano;

IV. efetuar, sistemática e permanentemente, avaliação de risco à saúde humana de cada sistema de abastecimento ou solução alternativa, por meio de informações sobre:

a) a ocupação da bacia contribuinte ao manancial e o histórico das características de suas águas;

b) as características físicas dos sistemas, práticas operacionais e de controle da qualidade da água;

c) o histórico da qualidade da água produzida e distribuída; e

d) a associação entre agravos à saúde e situações de vulnerabilidade do sistema.

V. auditar o controle da qualidade da água produzida e distribuída e as práticas operacionais adotadas;

VI. garantir à população informações sobre a qualidade da água e riscos à saúde associados, nos termos do inciso VI do artigo 9 deste Anexo;

VII. manter registros atualizados sobre as características da água distribuída, sistematizados de forma compreensível à população e disponibilizados para pronto acesso e consulta pública;

VIII. manter mecanismos para recebimento de queixas referentes às características da água e para a adoção das providências pertinentes;

IX. informar ao responsável pelo fornecimento de água para consumo humano sobre anomalias e não conformidades detectadas, exigindo as providências para as correções que se fizerem necessárias;

X. aprovar o plano de amostragem apresentado pelos responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, que deve respeitar os planos mínimos de amostragem expressos nas Tabelas 6, 7, 8 e 9;

XI. implementar um plano próprio de amostragem de vigilância da qualidade da água, consoante diretrizes específicas elaboradas pela SVS; e
XII. definir o responsável pelo controle da qualidade da água de solução alternativa.

Seção IV. Do Responsável pela Operação de Sistema e/ou Solução Alternativa

Art. 8º Cabe ao(s) responsável(is) pela operação de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, exercer o controle da qualidade da água.
Parágrafo único. Em caso de administração, em regime de concessão ou permissão do sistema de abastecimento de água, é a concessionária ou a permissionária a responsável pelo controle da qualidade da água.

Art. 9º Ao(s) responsável(is) pela operação de sistema de abastecimento de água incumbe:
I. operar e manter sistema de abastecimento de água potável para a população consumidora, em conformidade com as normas técnicas aplicáveis publicadas pela ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas e com outras normas e legislações pertinentes;
II. manter e controlar a qualidade da água produzida e distribuída, por meio de:
a) controle operacional das unidades de captação, adução, tratamento, reservação e distribuição;
b) exigência do controle de qualidade, por parte dos fabricantes de produtos químicos utilizados no tratamento da água e de materiais empregados na produção e distribuição que tenham contato com a água;
c) capacitação e atualização técnica dos profissionais encarregados da operação do sistema e do controle da qualidade da água; e
d) análises laboratoriais da água, em amostras provenientes das diversas partes que compõem o sistema de abastecimento.
III. manter avaliação sistemática do sistema de abastecimento de água, sob a perspectiva dos riscos à saúde, com base na ocupação da bacia contribuinte ao manancial, no histórico das características de suas águas, nas características físicas do sistema, nas práticas operacionais e na qualidade da água distribuída;
IV. encaminhar à autoridade de saúde pública, para fins de comprovação do atendimento a esta Norma, relatórios mensais com informações sobre o controle da qualidade da água, segundo modelo estabelecido pela referida autoridade;
V. promover, em conjunto com os órgãos ambientais e gestores de recursos hídricos, as ações cabíveis para a proteção do manancial de abastecimento e de sua bacia contribuinte, assim como efetuar controle das características das suas águas, nos termos do artigo 19 deste Anexo, notificando imediatamente a autoridade de saúde pública sempre que houver indícios de risco à saúde ou sempre que amostras coletadas apresentarem resultados em desacordo com os limites ou condições da respectiva classe de enquadramento, conforme definido na legislação específica vigente;
VI. fornecer a todos os consumidores, nos termos do Código de Defesa do Consumidor, informações sobre a qualidade da água distribuída, mediante envio de relatório, dentre outros mecanismos, com periodicidade mínima anual e contendo, no mínimo, as seguintes informações:
a) descrição dos mananciais de abastecimento, incluindo informações sobre sua proteção, disponibilidade e qualidade da água;
b) estatística descritiva dos valores de parâmetros de qualidade detectados na água, seu significado, origem e efeitos sobre a saúde; e

c) ocorrência de não conformidades com o padrão de potabilidade e as medidas corretivas providenciadas.

VII. manter registros atualizados sobre as características da água distribuída, sistematizados de forma compreensível aos consumidores e disponibilizados para pronto acesso e consulta pública;

VIII. comunicar, imediatamente, à autoridade de saúde pública e informar, adequadamente, à população a detecção de qualquer anomalia operacional no sistema ou não conformidade na qualidade da água tratada, identificada como de risco à saúde, adotando-se as medidas previstas no artigo 29 deste Anexo; e

IX. manter mecanismos para recebimento de queixas referentes às características da água e para a adoção das providências pertinentes.

Art. 10. Ao responsável por solução alternativa de abastecimento de água, nos termos do inciso XII do artigo 7 deste Anexo, incumbe:

I. requerer, junto à autoridade de saúde pública, autorização para o fornecimento de água apresentando laudo sobre a análise da água a ser fornecida, incluindo os parâmetros de qualidade previstos nesta Portaria, definidos por critério da referida autoridade;

II. operar e manter solução alternativa que forneça água potável em conformidade com as normas técnicas aplicáveis, publicadas pela ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, e com outras normas e legislações pertinentes;

III. manter e controlar a qualidade da água produzida e distribuída, por meio de análises laboratoriais, nos termos desta Portaria e, a critério da autoridade de saúde pública, de outras medidas conforme inciso II do artigo anterior;

IV. encaminhar à autoridade de saúde pública, para fins de comprovação, relatórios com informações sobre o controle da qualidade da água, segundo modelo e periodicidade estabelecidos pela referida autoridade, sendo no mínimo trimestral;

V. efetuar controle das características da água da fonte de abastecimento, nos termos do artigo 19 deste Anexo, notificando, imediatamente, à autoridade de saúde pública sempre que houver indícios de risco à saúde ou sempre que amostras coletadas apresentarem resultados em desacordo com os limites ou condições da respectiva classe de enquadramento, conforme definido na legislação específica vigente;

VI. manter registros atualizados sobre as características da água distribuída, sistematizados de forma compreensível aos consumidores e disponibilizados para pronto acesso e consulta pública;

VII. comunicar, imediatamente, à autoridade de saúde pública competente e informar, adequadamente, à população a detecção de qualquer anomalia identificada como de risco à saúde, adotando-se as medidas previstas no artigo 29; e

VIII. manter mecanismos para recebimento de queixas referentes às características da água e para a adoção das providências pertinentes.

CAPÍTULO IV. DO PADRÃO DE POTABILIDADE

Art.11. A água potável deve estar em conformidade com o padrão microbiológico da Tabela 1, a seguir:

Tabela 1. Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano.

Parâmetro	VMP[1]
Água para consumo humano[2]	
Escherichia coli ou coliformes termotolerantes[3]	Ausência em 100ml
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100ml
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
Escherichia coli ou coliformes termotolerantes[3]	Ausência em 100ml
Coliformes totais nos sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês	Ausência em 100ml em 95% das amostras examinadas no mês
Coliformes totais nos sistemas que analisam menos de 40 por mês	Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100ml

[1] Valor Máximo Permitido.
[2] Água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.
[3] A detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

§1º No controle da qualidade da água, quando forem detectadas amostras com resultado positivo para coliformes totais, mesmo em ensaios presuntivos, novas amostras devem ser coletadas em dias imediatamente sucessivos até que as novas amostras revelem resultado satisfatório.
§2º Nos sistemas de distribuição, a recoleta deve incluir, no mínimo, três amostras simultâneas, sendo uma no mesmo ponto e duas outras localizadas a montante e a jusante.
§3º Amostras com resultados positivos para coliformes totais devem ser analisadas para *Escherichia coli* e, ou, coliformes termotolerantes, devendo, neste caso, ser efetuada a verificação e confirmação dos resultados positivos.
§4º O percentual de amostras com resultado positivo de coliformes totais em relação ao total de amostras coletadas nos sistemas de distribuição deve ser calculado mensalmente, excluindo as amostras extras (recoleta).
§5º O resultado negativo para coliformes totais das amostras extras (recoletas) não anula o resultado originalmente positivo no cálculo dos percentuais de amostras com resultado positivo.
§6º Na proporção de amostras com resultado positivo admitidas mensalmente para coliformes totais no sistema de distribuição, expressa na Tabela 1, não são tolerados resultados positivos que ocorram em recoleta, nos termos do § 1º deste artigo.
§7º Em 20% das amostras mensais para análise de coliformes totais nos sistemas de distribuição, deve ser efetuada a contagem de bactérias heterotróficas e, uma vez excedidas 500 unidades formadoras de colônia (UFC) por ml, devem ser providenciadas imediata recoleta, inspeção local e, se constatada irregularidade, outras providências cabíveis.
§8º Em complementação, recomenda-se a inclusão de pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, de enterovírus, cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* sp.
§9º Em amostras individuais procedentes de poços, fontes, nascentes e outras formas de abastecimento sem distribuição canalizada, tolera-se a presença de coliformes totais, na ausência

de *Escherichia coli* e, ou, coliformes termotolerantes, nesta situação devendo ser investigada a origem da ocorrência, tomadas providências imediatas de caráter corretivo e preventivo e realizada nova análise de coliformes.

Art. 12. Para a garantia da qualidade microbiológica da água, em complementação às exigências relativas aos indicadores microbiológicos, deve ser observado o padrão de turbidez expresso na Tabela 2, abaixo:

Tabela 2. Padrão de turbidez para água pós-filtração ou pré-desinfecção.

Tratamento da água	VMP[1]
Desinfecção (água subterrânea)	1,0 UT[2] em 95% das amostras
Filtração rápida (tratamento completo ou filtração direta)	1,0 UT[2]
Filtração lenta	2,0 UT[2] em 95% das amostras

[1] Valor máximo permitido.
[2] Unidade de turbidez.

§ 1º Entre os 5% dos valores permitidos de turbidez superiores aos VMP estabelecidos na Tabela 2, o limite máximo para qualquer amostra pontual deve ser de 5,0 UT, assegurado, simultaneamente, o atendimento ao VMP de 5,0 UT em qualquer ponto da rede no sistema de distribuição.
§ 2º Com vistas a assegurar a adequada eficiência de remoção de enterovírus, cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* sp., recomenda-se, enfaticamente, que, para a filtração rápida, se estabeleça como meta a obtenção de efluente filtrado com valores de turbidez inferiores a 0,5 UT em 95% dos dados mensais e nunca superiores a 5,0 UT.
§ 3º O atendimento ao percentual de aceitação do limite de turbidez, expresso na Tabela 2, deve ser verificado, mensalmente, com base em amostras no mínimo diárias para desinfecção ou filtração lenta e a cada quatro horas para filtração rápida, preferivelmente, em qualquer caso, no efluente individual de cada unidade de filtração.

Art. 13. Após a desinfecção, a água deve conter um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5mg/L, sendo obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2mg/L em qualquer ponto da rede de distribuição, recomendando-se que a cloração seja realizada em pH inferior a 8,0 e tempo de contato mínimo de 30 minutos.

Parágrafo único. Admite-se a utilização de outro agente desinfetante ou outra condição de operação do processo de desinfecção, desde que fique demonstrado pelo responsável pelo sistema de tratamento uma eficiência de inativação microbiológica equivalente à obtida com a condição definida neste artigo.

Art.14. A água potável deve estar em conformidade com o padrão de substâncias químicas que representam risco para a saúde expresso na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3. Padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde.

Parâmetro	Unidade	VMP[1]
Inorgânicas		
Antimônio	mg/L	0,005
Arsênio	mg/L	0,01
Bário	mg/L	0,7
Cádmio	mg/L	0,005
Cianeto	mg/L	0,07
Chumbo	mg/L	0,01
Cobre	mg/L	2
Cromo	mg/L	0,05
Fluoreto[2]	mg/L	1,5
Mercúrio	mg/L	0,001
Nitrato (como N)	mg/L	10
Nitrito (como N)	mg/L	1
Selênio	mg/L	0,01
Orgânicas		
Acrilamida	µg/L	0,5
Benzeno	µg/L	5
Benzo[a]pireno	µg/L	0,7
Cloreto de Vinila	µg/L	5
1,2 Dicloroetano	µg/L	10
1,1 Dicloroeteno	µg/L	30
Diclorometano	µg/L	20
Estireno	µg/L	20
Tetracloreto de Carbono	µg/L	2
Tetracloroeteno	µg/L	40
Triclorobenzenos	µg/L	20
Tricloroeteno	µg/L	70
Agrotóxicos		
Alaclor	µg/L	20,0
Aldrin e Dieldrin	µg/L	0,03
Atrazina	µg/L	2
Bentazona	µg/L	300
Clordano (isômeros)	µg/L	0,2
2,4 D	µg/L	30
DDT (isômeros)	µg/L	2
Endossulfan	µg/L	20
Endrin	µg/L	0,6
Glifosato	µg/L	500
Heptacloro e Heptacloro epóxido	µg/L	0,03
Hexaclorobenzeno	µg/L	1
Lindano (ã-BHC)	µg/L	2
Metolacloro	µg/L	10
Metoxicloro	µg/L	20
Molinato	µg/L	6
Pendimetalina	µg/L	20
Pentaclorofenol	µg/L	9
Permetrina	µg/L	20
Propanil	µg/L	20
Simazina	µg/L	2
Trifluralina	µg/L	20
Cianotoxinas		
Microcistinas[3]	µg/L	1,0
Desinfetantes e produtos secundários da desinfecção		
Bromato	mg/L	0,025
Clorito	mg/L	0,2
Cloro livre[4]	mg/L	5
Monocloramina	mg/L	3
2,4,6 Triclorofenol	mg/L	0,2
Trihalometanos Total	mg/L	0,1

[1] Valor Máximo Permitido.
[2] Os valores recomendados para a concentração de íon fluoreto devem observar à legislação específica vigente relativa à fluoretação da água, em qualquer caso devendo ser respeitado o VMP desta Tabela.
[3] É aceitável a concentração de até 10 µg/L de microcistinas em até 3 (três) amostras, consecutivas ou não, nas análises realizadas nos últimos 12 (doze) meses.
[4] Análise exigida de acordo com o desinfetante utilizado.

§ 1º Recomenda-se que as análises para cianotoxinas incluam a determinação de cilindrospermopsina e saxitoxinas (STX), observando, respectivamente, os valores limites de 15,0 µg/L e 3,0 µg/L de equivalentes STX/L.
§ 2º Para avaliar a presença dos inseticidas organofosforados e carbamatos na água, recomenda-se a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase, observando os limites máximos de 15% ou 20% de inibição enzimática, quando a enzima utilizada for proveniente de insetos ou mamíferos, respectivamente.

Art. 15. A água potável deve estar em conformidade com o padrão de radioatividade expresso na Tabela 4, a seguir:

Tabela 4. Padrão de radioatividade para água potável.

Parâmetro	Unidade	VMP[1]
Radioatividade alfa global	BQ/L	0,1[2]
Radioatividade beta global	BQ/L	1,0[2]

[1] Valor máximo permitido.
[2] Se os valores encontrados forem superiores aos VMP, deverá ser feita a identificação dos radionuclídeos presentes e a medida das concentrações respectivas. Nesses casos, deverão ser aplicados, para os radionuclídeos encontrados, os valores estabelecidos pela legislação pertinente da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN, para se concluir sobre a potabilidade da água.

Art. 16. A água potável deve estar em conformidade com o padrão de aceitação de consumo expresso na Tabela 5, a seguir:

Tabela 5. Padrão de aceitação para consumo humano.

Parâmetro	Unidade	VMP[1]
Alumínio	mg/L	0,2
Amônia (como NH_3)	mg/L	1,5
Cloreto	mg/L	250
Cor Aparente	uH[2]	15
Dureza	mg/L	500
Etilbenzeno	mg/L	0,2
Ferro	mg/L	0,3
Manganês	mg/L	0,1
Monoclorobenzeno	mg/L	0,12
Odor		Não objetável[3]
Gosto		Não objetável[3]
Sódio	mg/L	200
Sólidos dissolvidos totais	mg/L	1.000
Sulfato	mg/L	250
Sulfeto de Hidrogênio	mg/L	0,05
Surfactantes	mg/L	0,5
Tolueno	mg/L	0,17
Turbidez	UT[4]	5
Zinco	mg/L	5
Xileno	mg/L	0,3

[1] Valor máximo permitido.
[2] Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).
[3] Critério de referência
[4] Unidade de turbidez.

§ 1º Recomenda-se que, no sistema de distribuição, o pH da água seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5.
§ 2º Recomenda-se que o teor máximo de cloro residual livre, em qualquer ponto do sistema de abastecimento, seja de 2,0 mg/L.
§ 3º Recomenda-se a realização de testes para detecção de odor e gosto em amostras de água coletadas na saída do tratamento e na rede de distribuição de acordo com o plano mínimo de amostragem estabelecido para cor e turbidez nas Tabelas 6 e 7.

Art. 17. As metodologias analíticas para determinação dos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e de radioatividade devem atender às especificações das normas nacionais que disciplinem a matéria, da edição mais recente da publicação *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,* de autoria das instituições *American Public Health Association* (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF), ou das normas publicadas pela ISO (International Standartization Organization).

§ 1º Para análise de cianobactérias e cianotoxinas e comprovação de toxicidade por bioensaios em camundongos, até o estabelecimento de especificações em normas nacionais ou internacionais que disciplinem a matéria, devem ser adotadas as metodologias propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em sua publicação Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.

§ 2º Metodologias não contempladas nas referências citadas no § 1º e "caput" deste artigo, aplicáveis aos parâmetros estabelecidos nesta Norma, devem, para ter validade, receber aprovação e registro pelo Ministério da Saúde.

§ 3º As análises laboratoriais para o controle e a vigilância da qualidade da água podem ser realizadas em laboratório próprio ou não que, em qualquer caso, deve manter programa de controle de qualidade interna ou externa ou ainda ser acreditado ou certificado por órgãos competentes para esse fim.

CAPÍTULO V. DOS PLANOS DE AMOSTRAGEM

Art. 18. Os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água devem elaborar e aprovar, junto à autoridade de saúde pública, o plano de amostragem de cada sistema, respeitando os planos mínimos de amostragem expressos nas Tabelas 6, 7, 8 e 9.

Tabela 6. Número mínimo de amostras para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, em função do ponto de amostragem, da população abastecida e do tipo de manancial.

Parâmetro	Tipo de manancial	Saída do tratamento (número de amostras por unidade de tratamento)	Sistema de distribuição (reservatórios e rede)		
			População abastecida		
			<50.000 hab.	50.000 a 250.000 hab.	> 250.000 hab.
Cor, Turbidez, pH	Superficial	1	10	1 para cada 5.000 hab.	40 + (1 para cada 25.000 hab.)
	Subterrâneo	1	5	1 para cada 10.000 hab.	20 + (1 para cada 50.000 hab.)
CRL[1]	Superficial	1	(Conforme § 3º do artigo 18)		
	Subterrâneo	1			
Fluoreto	Superficial ou Subterrâneo	1	5	1 para cada 10.000 hab.	20 + (1 para cada 50.000 hab.)
Cianotoxinas	Superficial	(Cf. § 5º do art.18)	-	-	-
Trihalometanos	Superficial	1	1[2]	4[2]	4[2]
	Subterrâneo	-	1[2]	1[2]	1[2]
Demais parâmetros[3]	Superficial ou Subterrâneo	1	1[4]	1[4]	1[4]

[1] Cloro residual livre.

[2] As amostras devem ser coletadas, preferencialmente, em pontos de maior tempo de detenção da água no sistema de distribuição.

[3] Apenas será exigida obrigatoriedade de investigação dos parâmetros radioativos quando da evidência de causas de radiação natural ou artificial.

[4] Dispensada análise na rede de distribuição quando o parâmetro não for detectado na saída do tratamento e, ou, no manancial, à exceção de substâncias que potencialmente possam ser introduzidas no sistema ao longo da distribuição.

Tabela 7. Freqüência mínima de amostragem para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises físicas, químicas e de radioatividade, em função do ponto de amostragem, da população abastecida e do tipo de manancial.

Parâmetro	Tipo de manancial	Saída do tratamento (frequência por unidade de tratamento)	Sistema de distribuição (reservatórios e rede)		
			População abastecida		
			<50.000 hab.	50.000 a 250.000 hab.	> 250.000 hab.
Cor, Turbidez, pH, Fluoreto	Superficial	a cada 2 horas	mensal		
	Subterrâneo	diária			
CRL[1]	Superficial	a cada 2 horas	(Conforme § 3º do artigo 18)		
	Subterrâneo	diária			
Cianotoxinas	Superficial	semanal (Cf. § 5º do art.18)	-	-	-
Trihalometanos	Superficial	trimestral	trimestral	trimestral	trimestral
	Subterrâneo	-	anual	semestral	semestral
Demais parâmetros[3]	Superficial ou Subterrâneo	semestral	semestral[3]	semestral[3]	semestral[3]

[1] Cloro residual livre.

[2] Apenas será exigida obrigatoriedade de investigação dos parâmetros radioativos quando da evidência de causas de radiação natural ou artificial.

[3] Dispensada análise na rede de distribuição quando o parâmetro não for detectado na saída do tratamento e, ou, no manancial, à exceção de substâncias que potencialmente possam ser introduzidas no sistema ao longo da distribuição.

Tabela 8. Número mínimo de amostras mensais para o controle da qualidade da água de sistema de abastecimento, para fins de análises microbiológicas, em função da população abastecida.

Parâmetro	Sistema de distribuição (reservatórios e rede)			
	População abastecida			
	< 5.000 hab.	5.000 a 20.000 hab.	20.000 a 250.000 hab.	> 250.000 hab.
Coliformes totais	10	1 para cada 500 hab.	30 + 1 para cada 2.000 hab.	105 + 1 para cada 5.000 hab. (máximo de 1.000)

Nota: Na saída de cada unidade de tratamento devem ser coletadas, no mínimo, 2 (duas) amostras semanais, recomendando-se a coleta de, pelo menos, 4 (quatro) amostras semanais.

Tabela 9. Número mínimo de amostras e freqüência mínima de amostragem para o controle da qualidade da água de solução alternativa, para fins de análises físicas, químicas e microbiológicas, em função do tipo de manancial e do ponto de amostragem.

Parâmetro	Tipo de manancial	Saída do tratamento (para água canalizada)	Número de amostras retiradas no ponto de consumo[1] (para cada 500 hab.)	Freqüência de amostragem
Cor, turbidez, pH e coliformes totais[2]	Superficial	1	1	semanal
	Subterrâneo	1	1	mensal
CRL[2] [3]	Superficial ou subterrâneo	1	1	diário

[1] Devem ser retiradas amostras em, no mínimo, 3 pontos de consumo de água.

[2] Para veículos transportadores de água para consumo humano, deve ser realizada 1 (uma) análise de CRL em cada carga e 1 (uma) análise, na fonte de fornecimento, de cor, turbidez, PH e coliformes totais com freqüência mensal, ou outra amostragem determinada pela autoridade de saúde pública.

[3] Cloro residual livre.

§ 1º A amostragem deve obedecer aos seguintes requisitos:

I. distribuição uniforme das coletas ao longo do período; e

II. representatividade dos pontos de coleta no sistema de distribuição (reservatórios e rede), combinando critérios de abrangência espacial e pontos estratégicos, entendidos como aqueles

próximos a grande circulação de pessoas (terminais rodoviários, terminais ferroviários, etc.) ou edifícios que alberguem grupos populacionais de risco (hospitais, creches, asilos, etc.), aqueles localizados em trechos vulneráveis do sistema de distribuição (pontas de rede, pontos de queda de pressão, locais afetados por manobras, sujeitos à intermitência de abastecimento, reservatórios, etc.) e locais com sistemáticas notificações de agravos à saúde tendo como possíveis causas agentes de veiculação hídrica.
§ 2º No número mínimo de amostras coletadas na rede de distribuição, previsto na Tabela 8, não se incluem as amostras extras (recoletas).
§ 3º Em todas as amostras coletadas para análises microbiológicas deve ser efetuada, no momento da coleta, medição de cloro residual livre ou de outro composto residual ativo, caso o agente desinfetante utilizado não seja o cloro.
§ 4º Para uma melhor avaliação da qualidade da água distribuída, recomenda-se que, em todas as amostras referidas no § 3º deste artigo, seja efetuada a determinação de turbidez.
§ 5º Sempre que o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, exceder 20.000 células/ml (2mm3/L de biovolume), durante o monitoramento que trata o § 1º do artigo 19, será exigida a análise semanal de cianotoxinas na água na saída do tratamento e nas entradas (hidrômetros) das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis, sendo que esta análise pode ser dispensada quando não houver comprovação de toxicidade na água bruta por meio da realização semanal de bioensaios em camundongos.

Art. 19. Os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistemas e de soluções alternativas de abastecimento supridos por manancial superficial devem coletar amostras semestrais da água bruta, junto do ponto de captação, para análise de acordo com os parâmetros exigidos na legislação vigente de classificação e enquadramento de águas superficiais, avaliando a compatibilidade entre as características da água bruta e o tipo de tratamento existente.
§ 1º O monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer freqüência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/ml (ou 1mm3/L de biovolume), e semanal, quando o número de cianobactérias exceder este valor.
§ 2º É vedado o uso de algicidas para o controle do crescimento de cianobactérias ou qualquer intervenção no manancial que provoque a lise das células desses microrganismos, quando a densidade das cianobactérias exceder 20.000 células/ml (ou 2mm3/L de biovolume), sob pena de comprometimento da avaliação de riscos à saúde associados às cianotoxinas.

Art. 20. A autoridade de saúde pública, no exercício das atividades de vigilância da qualidade da água, deve implementar um plano próprio de amostragem, consoante diretrizes específicas elaboradas no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS.

CAPÍTULO VI. DAS EXIGÊNCIAS APLICÁVEIS AOS SISTEMAS E SOLUÇÕES ALTERNATIVAS DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA

Art. 21. O sistema de abastecimento de água deve contar com responsável técnico, profissionalmente habilitado.

Art. 22. Toda água fornecida coletivamente deve ser submetida a processo de desinfecção, concebido e operado de forma a garantir o atendimento ao padrão microbiológico desta Norma.

Art. 23. Toda água para consumo humano suprida por manancial superficial e distribuída por meio de canalização deve incluir tratamento por filtração.

Art. 24. Em todos os momentos e em toda sua extensão, a rede de distribuição de água deve ser operada com pressão superior à atmosférica.
§ 1º Caso esta situação não seja observada, fica o responsável pela operação do serviço de abastecimento de água obrigado a notificar a autoridade de saúde pública e informar à população, identificando períodos e locais de ocorrência de pressão inferior à atmosférica.
§ 2º Excepcionalmente, caso o serviço de abastecimento de água necessite realizar programa de manobras na rede de distribuição, que possa submeter trechos a pressão inferior à atmosférica, o referido programa deve ser previamente comunicado à autoridade de saúde pública.

Art. 25. O responsável pelo fornecimento de água por meio de veículos deve:
I. garantir o uso exclusivo do veículo para este fim;
II. manter registro com dados atualizados sobre o fornecedor e, ou, sobre a fonte de água; e
III. manter registro atualizado das análises de controle da qualidade da água.
§ 1º A água fornecida para consumo humano por meio de veículos deve conter um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/L.
§ 2º O veículo utilizado para fornecimento de água deve conter, de forma visível, em sua carroceria, a inscrição: "ÁGUA POTÁVEL".

CAPÍTULO VII. DAS PENALIDADES

Art. 26. Serão aplicadas as sanções administrativas cabíveis, aos responsáveis pela operação dos sistemas ou soluções alternativas de abastecimento de água, que não observarem as determinações constantes desta Portaria.

Art. 27. As Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos municípios estarão sujeitas a suspensão de repasse de recursos do Ministério da Saúde e órgãos ligados, diante da inobservância do contido nesta Portaria.

Art. 28. Cabe ao Ministério da Saúde, por intermédio da SVS/MS, e às autoridades de saúde pública dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, representadas pelas respectivas Secretarias de Saúde ou órgãos equivalentes, fazer observar o fiel cumprimento desta Norma, nos termos da legislação que regulamenta o Sistema Único de Saúde - SUS.

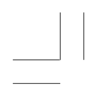
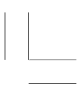
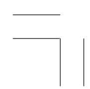
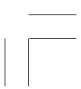
CAPÍTULO VIII. DAS DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 29. Sempre que forem identificadas situações de risco à saúde, o responsável pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento de água e as autoridades de saúde pública devem estabelecer entendimentos para a elaboração de um plano de ação e tomada das medidas cabíveis, incluindo a eficaz comunicação à população, sem prejuízo das providências imediatas para a correção da anormalidade.

Art. 30. O responsável pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento de água pode solicitar à autoridade de saúde pública a alteração na freqüência mínima de amostragem de determinados parâmetros estabelecidos nesta Norma.
Parágrafo único. Após avaliação criteriosa, fundamentada em inspeções sanitárias e, ou, em histórico mínimo de dois anos do controle e da vigilância da qualidade da água, a autoridade de saúde pública decidirá quanto ao deferimento da solicitação, mediante emissão de documento específico.

Art. 31. Em função de características não conformes com o padrão de potabilidade da água ou de outros fatores de risco, a autoridade de saúde pública competente, com fundamento em relatório técnico, determinará ao responsável pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento de água que amplie o número mínimo de amostras, aumente a freqüência de amostragem ou realize análises laboratoriais de parâmetros adicionais ao estabelecido na presente Norma.

Art. 32. Quando não existir na estrutura administrativa do estado a unidade da Secretaria de Saúde, os deveres e responsabilidades previstos no artigo 6º deste Anexo serão cumpridos pelo órgão equivalente.

Anexo 3

Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em alimentos

DEFINIÇÕES

Microrganismos em alimentos

No âmbito desse manual, são considerados dois grupos de microrganismos em alimentos, os fungos e as bactérias.

Fungos (bolores e leveduras). Os fungos são organismos eucarióticos, cujas células apresentam núcleo distinto. Nessa estrutura, delimitada por uma membrana, está contido o material genético (DNA), composto de múltiplos cromossomos. A compactação do DNA no núcleo é auxiliada por proteínas histônicas, que também são importantes na regulação da expressão genética.

Bolores. Os bolores são fungos filamentosos, cuja estrutura básica são filamentos denominados hifas. As hifas podem ser septadas (divididas em células que se intercomunicam através de poros) ou não septadas (cenocíticas). Nas cenocíticas, os núcleos das células ficam dispersos ao longo de toda a hifa. O conjunto de hifas forma o micélio, que confere às colônias de bolores uma aparência cotonosa e aveludada, podendo ser aéreas. A reprodução se dá através da formação de esporos, que podem ser sexuados ou não.

Leveduras. As leveduras são fungos não filamentosos, cuja estrutura básica é unicelular. A reprodução não sexuada ocorre através de brotamento (mais raramente por fissão), enquanto a sexuada ocorre através da formação de esporos.

Anamorfos e teleomorfos. A classificação primária dos fungos é feita com base na morfologia dos esporos sexuais ou na sua ausência. Os que não apresentam a fase sexuada (perfeita) do ciclo reprodutivo, são também chamados de fungos imperfeitos. Muitos fungos perfeitos se reproduzem (na natureza ou em condições de laboratório) no seu estado imperfeito, apresentando dois nomes, o da fase perfeita e o da fase imperfeita. Nesses casos, o estado perfeito é conhecido como teleomórfico e o imperfeito como anamorfico.

Bolores toxigênicos. Algumas espécies de bolores produzem compostos tóxicos de metabolismo, chamados de micotoxinas. Os mais importantes em alimentos são espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, cujas micotoxinas estão descritas nos Quadros 1, 2 e 3.

Bactérias. As bactérias são organimos unicelulares procarióticos, cujas células não apresentam núcleo distinto delimitado por membrana. O DNA encontra-se disperso no citoplasma ou em forma de anéis (plasmídios), não associado com proteínas histônicas. As células são mais simples do que as eucarióticas, não apresentando organelas. A reprodução é não sexuada, ocorrendo por fissão (divisão) celular.

Forma e arranjo das bactérias. A morfologia das células bacterianas é bastante variada, incluindo cocos, bastonetes, cocobacilos, vibrios e espiralados. Nem sempre, na divisão celular, as células se separam totalmente. Quando permanecem unidas, podem formar arranjos distintos, como pares de células, grupo de quatro células (tétrades), cadeias de células ou cachos de células. Os arranjos estão melhor explicados na definição de cocos.

Cocos. São células bacterianas arredondadas, que podem se dividir sem um plano de orientação definido. Isso leva a um grande número de arranjos diferentes, dependendo do(s) plano(s) em que ocorre a divisão celular. Podem ser formados cocos isolados, cocos em pares (diplococos), cocos em tétrades, cocos em cadeias (chamados de estreptococos) e cocos em massas irregulares que lembram um cacho de uvas (chamados estafilococos). Também podem ser formados cocos em cubos com oito células, mas esse arranjo não é encontrado nas bactérias comuns em alimentos. Muitas das bactérias em forma de cocos têm o sufixo "coccus" no final do nome genérico, como *Enteroccus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* (arranjo predominate em cadeias, razão porque esse arranjo é chamado estreptococos) e *Staphylococcus* (arranjo predominate em cachos, razão porque esse arranjo é chamado estafilococos).

Bastonetes. São células bacterianas em forma de bastão (também chamados de bacilos), cujas extremidades podem ser retas, arredondadas ou afiladas Seu plano de divisão é fixo, ocorrendo sempre no menor eixo. Em função disso, exibem uma menor variedade de arranjos, sendo via de regra encontrados isolados, em pares ou em cadeias. Há ainda um arranjo, denominado "em paliçada" ou "em letras chinesas", que ocorre quando a parede celular do organismo é dupla. No momento da divisão celular, apenas uma das camadas se rompe, deixando as células unidas pela camada que não se rompeu. Muitas bactérias em forma de bastonetes têm o nome genérico *Bacillus* (*Bacillus coagulans, Bacillus cereus*) ou o sufixo "bacillus" no nome genérico (*Lactobacillus, Sporolactobacillus, Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, etc.). Muitas têm o sufixo "monas" no nome genérico, como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Halomonas*, etc.

Cocobacilos. São células bacterianas que apresentam uma forma intermediária entre os cocos e os bastonetes. São bastonetes muito pequenos, cocoides, mas maiores do que os cocos.

Vibrios. São células bacterianas em forma de bastonetes curvos, lembrando uma pequena vírgula ou uma meia lua. Muitas bactérias com essa morfologia têm o nome genérico Vibrio, como Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, etc.

Espiralados. São células bacterianas com forma de espiral, bem mais raras em alimentos do que os cocos, os bastonetes e os vibrios. Um dos gêneros encontrados é Campylobacter.

Bactérias Gram negativas e Gram positivas. A maioria das bactérias conhecidas apresenta parede celular, uma estrutura rígida que mantém a forma e protege a célula contra o choque osmótico. Em 1884, Christian Gram desenvolveu um método de coloração de bactérias que permitia sua separação em dois grupos distintos, as Gram positivas (que coravam-se em roxo) e as Gram negativas (que coravam-se em rosa). Esta diferença na coloração de Gram é relacionada à diferenças na composição da parede celular. Nas bactérias Gram positivas, cerca de 90% da parede celular é composta pelo peptídeoglicano e o restante é, essencialmente, ácido teicóico. Nas bactérias Gram negativas, apenas cerca de 10% da parede corresponde ao peptideoglicano. Os demais componentes são fosfolipídeos, lipoproteínas, proteínas e, também, lipopolissacarídeos. A coloração de Gram consiste em tratar as células, sucessivamente, com cristal violeta, iodo (lugol), álcool (ou acetona) e safranina (ou fuccina) (vide capítulo 5). A parede das Gram negativas tem um teor elevado de lípidos, que é dissolvido durante o tratamento com o álcool. Isso elimina o corante primário (cristal violeta) e as células ficam coradas de rosa pela safranina ou fucsina. Nas

Gram positivas, como a parede é constituída principalmente de peptidoglicano, o corante primário não é eliminado, permanecendo a coloração roxa.

Esporos de bactérias. Algumas espécies de bactérias produzem estruturas de resistência, chamadas de esoros. Os esporos resistem a condições ambientais que seriam letais para as células vegetativas, suportando o congelamento, a desidratação, a irradiação, a presença de conservantes, o tratamento com desinfetantes e a exposição a altas temperaturas. Uma vez formados, permanecem em estado de dormência e, ao contrário das células vegetativas, não apresentam atividade metabólica e não se multiplicam. Em condições favoráveis, podem germinar e dar origem a novas células vegetativas.

Bactérias esporogênicas. As espécies de bactérias capazes de produzir esporos são chamadas de esporogênicas.

Células vegetativas. As células das bactérias, na sua forma normal (metabolicamente ativa) são chamadas de vegetativas, para diferenciar dos esporos. Células vegetativas não são resistentes a condições ambientais extremas. Esse termo também é usado para diferenciar as células de bolores (não resistentes ao calor) dos esporos de bolores termorresistentes.

Esporângio. Os esporos das bactérias esporogênicas são formados no interior das células vegetativas e, posteriormente, liberados através na lise das células. Enquanto não liberados, a célula que formou e abriga o esporo é chamada de esporângio.

Fatores que afetam o crescimento dos microrganismos nos alimentos

Os microrganismos necessitam de condições apropriadas para sua reprodução, crescimento e sobrevivência. O conhecimento dos fatores que favorecem ou inibem a sua multiplicação é fundamental para uma melhor compreensão dos princípios básicos que regem a alteração e a conservação dos alimentos. Alguns desses fatores são intrínsecos, ou seja, características inerentes aos alimentos, como a atividade de água, o pH, o potencial de óxido redução, a composição química, a presença de nutrientes ou de fatores antimicrobianos naturais e a microbiota do alimento. Outros são extrínsecos, ou seja, características e/ou condições do meio ambiente no qual o alimento se encontra, como a temperatura, a atmosfera e a umidade relativa. Os fatores que têm maior impacto sobre o crescimento microbiano nos alimentos são a atividade de água, o pH e a temperatura. As condições de crescimento das principais bactérias patogênicas e bolores toxigênicos associados aos alimentos, com relação a esses fatores, encontram-se sumariadas nos Quadros 4 e 5.

Atividade de água (a_w). É um conceito químico definido como a relação entre a pressão de vapor de um determinado material (p) e a pressão de vapor da água pura (p_0), nas mesmas condições: **($a_w = p/p_0$)**. Os valores de atividade de água são numericamente iguais aos de umidade relativa de equilíbrio (ERH), expressados como decimal. Isso significa que, se uma amostra de alimento for mantida em um frasco selado, a uma temperatura constante, até que a água da amostra entre em equilíbrio com o vapor de água do ar, no espaço livre do frasco, a atividade de água do alimento será igual à umidade relativa de equilíbrio do ar dividida por 100: **a_w (alimento) = ERH (ar)/100**. Em termos práticos, a atividade de água de um alimento reflete a quantidade de água livre disponível, isto é, água não comprometida com ligações químicas, dissolução de solutos, etc. Assim, quanto maior a atividade de água do produto, maior a quantidade de água livre disponível. Do ponto de vista microbiológico, esse é um fator dominante no controle da deterioração dos alimentos, porque o crescimento dos microrganismos é absolutamente dependente da disponibilidade de água livre. Assim, quanto menor for a atividade de água de um

alimento, menor será o número de grupos microbianos capazes de crescer nesse produto. A atividade de água é expressa numericamente, variando de 0 a 1,0. Na água pura é igual a 1,0 e a adição de solutos como sal e açúcar à água reduz a atividade de água, conforme mostrado nos Quadro 6 e 7.

Classificação dos alimentos quanto à atividade de água. Nos alimentos a atividade de água é bastante variada, embora a maioria dos produtos frescos (carne, leite, ovos, vegetais e frutas) apresentem valores acima de 0,95 (Quadro 8). Em função desse parâmetro, os produtos são classificados como de alta umidade, umidade intermediária ou baixa umidade.

Alimentos de Alta Umidade (High Moisture Food = HMF). São aqueles com atividade de água acima de 0,90, como leite e seus derivados (exceto leite em pó e queijos duros), carne e seus derivados (exceto carne seca e alguns embutidos curados e/ou fermentados), vegetais não desidratados, frutas e seus sucos e polpas não concentrados, massas frescas.

Alimentos de Umidade Intermediária (Intermediate Moisture Food = IMF). São aqueles com atividade de água entre 0,89 e 0,60, como carne seca, peixes salgados (tipo bacalhau), frutas secas, xaropes de açúcar, sucos de frutas concentrados, caldo de carne concentrado, leite condensado, goiabada e marmelada, caldas e coberturas carameladas, queijos duros, alguns produtos cárneos curados como salame, alimentos congelados e rações para cães e gatos.

Alimentos de Baixa Umidade (Low Moisture Food = LMF). São aqueles com atividade de água menor do que 0,60, como produtos em pó (leite, café solúvel, pós para sopas ou pudins, gelatina, etc.), frutas liofilizadas, massas secas, biscoitos, condimentos secos, grãos e cereais.

Atividade de água mínima dos microrganismos. Na escala de 0 a 1,00, a vida é possível na faixa de 1,00 a 0,60, com mínimo de 0,99 para crescimento dos animais, 0,98 para crescimento das plantas e 0,90 para a maioria dos microrganismos. Abaixo de 0,90, o crescimento microbiano é quase que totalmente restrito aos bolores e leveduras, sendo raras as bactérias capazes de se desenvolver (Quadro 9). Dentre essas inclue-se *Staphylococcus aureus*, uma das poucas bactérias patogênicas capaz de crescer condições de baixa atividade de água e *Halococcus* e *Halobacterium*, bactérias extremamente halófilas, com atividade de água mínima igual a 0,75 e crescimento dependente de altas concentrações de sal.

Classificação dos microrganismos quanto à atividade de água mínima para crescimento. Por razões práticas, a classificação dos microrganismos em função da atividade de água é baseada na concentração de solutos em que podem crescer. A terminologia usada inclui os seguintes termos: Halófilo, halofílico ou halotolerante, relacionados com a presença de sal (NaCl ou outro). Osmófilos, osmofílicos ou osmotolerante, relacionados com a presença de solutos orgânicos, particularmente açúcares. Xerofílico ou xerotolerante, usado principalmente para bolores, sem obrigatória correlação com solutos.

Bactérias halófilas. As bactérias halófilas necessitam de sal (NaCl ou outro) para crescimento. Nos alimentos, as levemente halófilas apresentam concentração ótima de sal entre 0,5 e 3%, incluindo principalmente espécies de origem marinha dos gêneros *Shewanella*, *Listonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Photobacterium*. As moderadamente halófilas apresentam concentração ótima de sal entre 3 e 15%, incluindo espécies dos gêneros *Micrococcus*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Marinococcus*. As extremamente halófilas apresentam concentração ótima de sal entre 15 e 30%, incluindo os gêneros *Halococcus* e *Halobacterium*.

Bactérias halotolerantes. São bactérias que crescem em concentrações de sal acima de 5%, mas não dependem da presença do sal para crescer. Inclui principalmente espécies Gram positivas dos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*.

Fungos xerofílicos. Fungos xerofílicos são aqueles capazes de crescer em atividade de água abaixo de 0,85, mesmo que não em toda e qualquer condição de pH, temperatura, potencial redox e outros fatores de crescimento. No Quadro 11 encontra-se uma lista dos fungos reconhecidos como xerofílicos. Os xerofílicos moderados são definidos como aqueles capazes de crescer em a_w abaixo de 0,85, mas não são fastidiosos em seus requerimentos de condições especiais para crescimento. Neste grupo encontram-se as espécies xerofílicas de *Penicillium, Aspergillus* (particularmente a série de *Aspergillus restrictus*) e *Eurotium* (série *Aspergillus glaucus*), as cepas de *Wallemia sebi* e poucos outros. Os xerofílicos fastidiosos extremos são aqueles que, além de exigirem a_w reduzida para crescimento, também crescem pobremente quando o soluto no meio de cultura não é um açúcar. Nesse grupo encontram-se X*eromyces bisporus, Chrysosporium fastidium, Chrysosporium farinicola, Chrysosporium inops, Chrysosporium xerophilum, Eremascus albus* e *Eremascus fertilis.* Os fungos *Basipeptospora halophila* e *Polypaecium pisce* são descritos como bolores halofílicos, que crescem melhor na presença de cloreto de sódio do que em meios só com carboidratos.

Leveduras osmofílicas e halófilas. A maioria das leveduras apresenta atividade de água mínima de crescimento na faixa de 0,88. As leveduras que crescem abaixo do limite de 0,88 são comumente conhecidas como osmófilas ou osmofílicas (aquelas que crescem em altas concentrações de açúcar) ou halófilas (aquelas que crescem em altas concentrações de sal).

pH. O pH ou potencial hidrogeniônico é um parâmetro que mede o nível de acidez de um produto, conforme a relação: pH = -log $[H^+]$ = log $[1/[H^+]$, onde $[H^+]$ é a concentração hidrogeniônica do ácido dissociado. A escala de pH vai de zero a 14. Em pH sete (neutralidade), as concentrações de H^+ e OH^- são iguais. Valor de pH acima de sete indica solução alcalina (básica) e valor de pH baixo de sete indica solução ácida. De acordo com essa expressão, uma diferença de uma, duas ou três unidades de pH, implica numa diferença de 10, 100 ou 1000 vezes na concentração de $[H^+]$, respectivamente. Essa variação tem grande influência sobre a estabilidade enzimática e, consequentemente, sobre o crescimento microbiano. Os bolores e as leveduras são pouco afetados, crescendo bem em alimentos altamente ácidos (pH menor do que 3,7). As bactérias, ao contrário, são muito mais sensíveis à redução do pH, sendo raras as espécies acidúricas capazes de crescer em pH abaixo de 4,5.

Classificação dos alimentos quanto ao pH. Cameron & Esty (apud Herson & Hulland, 1980) dividiram os alimentos em quatro grupos, em função do pH: Grupo 1. Alimentos pouco ácidos, com pH acima de 5,3 (ervilha, milho, vagens, carnes, peixes, leite). Grupo 2. Alimentos levemente ácidos, com pH entre 5,3 e 4,5 (espinafre, aspargos, beterrabas, sopas, molhos). Grupo 3. Alimentos ácidos, com pH entre 4,5 e 3,7 (tomates, pêras, abacaxis, figos). Grupo 4. Alimento altamente ácidos, com pH menor do que 3,7 (chucrute, picles, sucos de frutas cítricas).

Classificação dos alimentos comercialmente estéreis quanto ao pH. A Food and Drug Administration (FDA) classifica os alimentos comercialmente estéreis como de baixa acidez ou ácidos (Landry *et al*, 2001). Alimentos de baixa acidez incluem os produtos com pH maior que 4,6 e atividade de água maior que 0,85 (exceto bebidas alcoólicas), como os derivados de carne (salsichas em lata, almôndegas em lata, patês de fígado ou presunto em lata ou vidro), derivados de peixes (sardinha em lata, atum em lata), derivados de leite (leite longa vida, creme de leite em lata ou caixinha), vegetais em lata ou vidro (ervilha, milho, seleta de legumes) e misturas (feijoada em lata, sopas em lata). Alimentos ácidos incluem os produtos com pH menor ou igual a 4,6, como os derivados de tomate, os vegetais acidificados (palmito, picles, azeitonas), as frutas em calda (figos, pêssegos, abacaxi) e os sucos de frutas em lata ou caixinha.

Bactérias acidúricas ou acidófilas. São as bactérias conseguem crescer em alimentos com pH abaixo de 4,5. Acidúricas são as que crescem em condições ácidas e, também, em pH neutro

ou alcalino. Acidófilas são as que crescem em condições ácidas e não crescem em pH neutro ou acima. As mais importantes são as bactérias acéticas (*Acetobacter* e *Gluconobacter*), as bactérias lácticas (*Lactobacillus* e outras), *Alicyclobacillus* e algumas espécies dos gêneros *Bacillus* (*B. coagulans*) e *Clostridium* (*C. butyricum, C. pasteurianum, C. tyrobutyricum, C. beijerinckii* e *C. acetobutylicum*).

FATORES DE CRESCIMENTO

Quadro 1. Micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus*

Espécie	Micotoxinas
Aspergillus candidus	candidulina, terfenilina, xantoascina
Aspergillus carbonarius	ocratoxina
Aspergillus clavatus	ascladiol, clavatol, ácido kójico, patulina
Aspergillus flavus	aflatoxinas, aflatrem, ácido aspergílico, ácido ciclopiazônico
Aspergillus fumigatus	fumigaclavina, fumigalina, fumigatina, fumitoxonas, gliotoxina
Aspergillus niger	malformina, naftoquinonas
Aspergillus nomius	aflatoxinas
Aspergillus ochraceus	ocratoxina A, ácido penicílico
Aspergillus oryzae	aspergilomarasmina, orizacidina, maltorizina
Aspergillus parasiticus	aflatoxinas, ácido aspergílico, ácido kójico
Aspergillus sydowii	esterigmatocistina, griseofulvina
Aspergillus tamarii	ácido ciclopiazônico, fumigaclavina A
Aspergillus terreus	citreoviridina, citrinina, patulina, terreina
Aspegillus ustus	austamide, austadiol, austinas, austocistinas
Aspergillus versicolor	esterigmatocistina, nidulotoxina
Aspergillus wentii	emodina, ácido kójico, wentilactona

Fonte: Taniwaki & Silva (2001)

Quadro 2. Micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium*.

Espécie	Micotoxinas
Fusarium acuminatum	tricotecenos
Fusarium avenaceum	moniliformina
Fusarium culmorum	zearalenona, tricotecenos, culmorina, butenolide
Fusarium equiseti	equisetina, zearalenona, tricotecenos
Fusarium graminearum	zearalenona, tricotecenos, butenolide, culmorina, fusarina C
Fusarium oxysporum	moniliforminas, ácido fusárico, fusarina C
Fusarium pallidoroseum	zearalenona, tricotecenos A
Fusarium poae	tricotecenos A, butenolide
Fusarium sambucinum	zearalenona, eniatinas
Fusarium solani	naftoquinonas, ácido fusárico
Fusarium sporotrichioides	tricotecenos A, butenolide
Fusarium tricinctum	butenolide
Fusarium verticillioides	Fumonisinas, moniliformina, fusarina C, giberelinas, ácido fusárico, naftoquinonas

Fonte: Taniwaki & Silva (2001).

Quadro 3. Micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium*.

Espécie	Micotoxina
Penicillium aurantiogriseum	Ácido penicílico, xantomegnina, viomelina, viridicatina
Penicillium brasilianum	Ácido penicílico, verruculogeno, toxina viridicatum, verruculotoxina
Penicillium brevicompactum	Brevianamides, ácido micofenólico, botriodiploidina
Penicillium camenberti	Ácido ciclopiazônico
Penicillium chrysogenum	Roquefortina C, toxina PR
Penicillium citreonigrum	Citreoviridina, citrinina
Penicillium citrinum	Citrinina
Penicillium commune	Ácido ciclopiazônico, ácido ciclopaldico, rugulovasinas
Penicillium coprophilum	Griseofulvina, roquefortina C
Penicillium crustosum	Penitrem A, roquefortina C, isofumigaclavinas, ácido terrestrico
Penicillium echinulatum	Viridicatina
Penicillium expansum	Patulina, citrinina, roquefortina C
Penicillium glabrum	Citromicetina
Penicillium griseofulvum	Patulina, ácido ciclopiazônico, roquefortina C, griseofulvina
Penicillium islandicum	Cicloclorotina, luteoskirina, islanditoxina, emodina
Penicillium italicum	Deoxibrevianamida E
Penicillium hirsutum	Roquefortina C, ácido terrestrico
Penicillium hordeisum	Roquefortina C, ácido terrestrico
Penicillium verrucosum	Ocratoxina, Citrinina

Fonte: Taniwaki & Silva (2001).

Quadro 4. Limites de temperatura, pH e atividade de água (e/ou concentração de NaCl) de crescimento das principais bactérias patogênicas veiculadas por alimentos.

Bactéria (fonte)	Fator	mínimo	ótimo	máximo
Aeromonas (1)	Temperatura (ºC)	>0 <4	28 a 35	>42 <45
	pH	<4,5	7,2	-
	% NaCl	-	1 a 2	>5 <6
Bacillus cereus (1)	Temperatura (ºC)	4	30 a 40	55
	pH	5,0	6,0 a 7,0	8,8
	Atividade de água	0,93	-	-
Brucella (1)	Temperatura (ºC)	6	37	42
	pH	4,5 a 5,1	7,3 a 7,5	8,2 a 8,8
	% NaCl	-	-	<4
Campylobacter (1)	Temperatura (ºC)	32	42 a 43	45
	pH	4,9	6,5 a 7,5	~ 9
	Atividade de água	>0,98	0,997	-
	% NaCl	-	0,5	7
Clostridium botulinum Grupo I - tipos A, B, F (1, 2)	Temperatura (ºC)	10 a12	35 a 40	48
	pH	>4,6	-	<8,5
	Atividade de água	>0,94	-	-
	% NaCl	-	-	<10
Clostridium botulinum Grupo II - tipos B, E, F (1, 2)	Temperatura (ºC)	3,3	28 a 30	45
	pH	>5,0	-	<8,5
	Atividade de água	>0,97	-	-
	% NaCl	-	-	<5

Quadro 4. Continuação.

Bactéria (fonte)	Fator	mínimo	ótimo	máximo
Clostridium perfringens (1)	Temperatura (ºC)	12	43 a 47	50
	pH	5,5 a 5,8	7,2	8,0 a 9,0
	Atividade de água	0,93	0,95 a 0,96	-
Escherichia coli enteropatogênica (1)	Temperatura (ºC)	~ 7 a 8	35 a 40	~ 44 a 46
	pH	4,4	6,0 a 7,0	9,0
	Atividade de água	0,95	0,995	-
Listeria monocytogenes (1)	Temperatura (ºC)	0,4 negativo	37	45
	pH	4,39	7,0	9,4
	Atividade de água	0,92	-	-
Plesiomonas (1)	Temperatura (ºC)	8	30	45
	pH	4,0	7,0	9,0
	% NaCl	-	-	5
Salmonella (1)	Temperatura (ºC)	5,2[a]	35 a 43	46,2
	pH	3,8	7,0 a 7,5	9,5
	Atividade de água	0,94	0,99	>0,99
Shigella sonnei (1)	Temperatura (ºC)	6,1	-	47,1
	pH	4,9	-	9,34
	% NaCl	-	-	5,18
Shigella flexneri (1)	Temperatura (ºC)	7,9	-	45,2
	pH	5,0	-	9,19
	% NaCl	-	-	3,78
Staphylococcus aureus crescimento aeróbio(1)	Temperatura (ºC)	7	37	48
	pH	4,0	6,0 a 7,0	10,0
	Atividade de água	0,83	0,98	>0,99
Staphylococcus aureus produção de toxina aeróbio (1)	Temperatura (ºC)	10	40 a 45	48
	pH	4,5	7,0 a 8,0	9,6
	Atividade de água	0,87	0,98	>0,99
Streptococcus pyogenes (1)	Temperatura (ºC)	10 a 15	37	>40 <45
	pH	4,8 a 5,3	7,0	<9,3
	% NaCl	-	-	>4 <6,5
Vibrio cholerae (1)	Temperatura (ºC)	10	37	43
	pH	5,0	7,6	9,6
	Atividade de água	0,970	0,984	0,998
Vibrio parahaemolyticus (1)	Temperatura (ºC)	5	37	43
	pH	4,8	7,8 a 8,6	11,0
	Atividade de água	0,940	0,981	0,996
	% NaCl	0,5	3	10
Vibrio vulnificus (1)	Temperatura (ºC)	8	37	43
	pH	5,0	7,8	10,0
	Atividade de água	0,96	0,98	0,997
	% NaCl	0,5	2,5	5
Yersinia enterocolitica (1)	Temperatura (ºC)	1,3 negativo	25 a 37	42
	pH	4,2	7,2	<10
	% NaCl	-	-	<7
Yersinia pseudotuberculosis (3)	Temperatura (ºC)	5	-	43

[a] <7 para a maioria dos sorotipos.

Fonte: (1) = ICMSF (1996), (2) Hauschild (1989), (3) FDA/CFSAN (1999)

Quadro 5. Limite de temperatura, pH e atividade de água de crescimento dos principais bolores toxigênicos importantes em alimentos.

Bolor	Fator	mínimo	ótimo	máximo
Aspergillus flavus crescimento	Temperatura (ºC)	10 a 12	33	43
	pH	2,0	5,0 a 8,0	>11,0
	Atividade de água	0,80	0,98	>0,99
Aspergillus flavus produção de aflatoxina	Temperatura (ºC)	13	16 a 31	31 a 37
	Atividade de água	0,82	0,95 a 0,99	>0,99
Aspergillus parasiticus crescimento	Temperatura (ºC)	12	32	42
	pH	2,0	5,0 a 8,0	>11,0
	Atividade de água	0,80 a 0,83	0,99	>0,99
Aspergillus parasiticus produção de aflatoxina	Temperatura (ºC)	12	25	40
	pH	2,0	6,0	>8,0
	Atividade de água	0,86 a 0,87	0,95	>0,99
Aspergillus ochraceus crescimento	Temperatura (ºC)	8,0	24 a 31	37
	pH	2,2	3,0 a 8,0	13,0
	Atividade de água	0,77 a 0,80	0,95 a 0,99	>0,99
Aspergillus ochraceus produção de ocratoxina	Temperatura (ºC)	12	31	37
	Atividade de água	0,83	0,95 a 0,99	>0,99
Aspergillus ochraceus produção ácido penicílico	Temperatura (ºC)	10	16	31
	Atividade de água	0,81	0,90	>0,99
Aspergillus versicolor crescimento	Temperatura (ºC)	9	25	35 a 40
	pH	3,1	4,0 a 8,0	-
	Atividade de água	0,76 a 0,80	0,93 a 0,97	>0,99
Fusarium equiseti crescimento	Temperatura (ºC)	-	-	~ 37
	pH	<3,3	5,0 a 8,0	>10,4
	Atividade de água	0,92	>0,99	>0,99
Fusarium graminearum crescimento	Temperatura (ºC)	desconhecida	24 a 26	desconhecida
	pH	<2,4	6,0 a 8,0	>10,2
	Atividade de água	0,90	>0,99	>0,99
Fusarium moniloforme crescimento	Temperatura (ºC)	2,5 a 5	22,5 a 27,5	32 a 37
	pH	<2,5	5,5 a 7,5	>10,6
	Atividade de água	0,87	>0,99	>0,99
Fusarium sporotrichioides crescimento	Temperatura (ºC)	2 negativo	22,5 a 27,5	35
	pH	<2,5	5,5 a 9,5	>10,6
	Atividade de água	0,88	>0,99	>0,99
Penicillium citreonigrum crescimento	Temperatura (ºC)	<5	20 a 24	37
	pH	<2,2	5,0 a 6,5	>10
	Atividade de água	≤0,80	-	-

Quadro 5. Continuação.

Bolor	Fator	mínimo	ótimo	máximo
Penicillium citrinum produção de citrinina	Temperatura (ºC)	<15	30	37
Penicillium crustosum crescimento	Temperatura (ºC)	<2	25	~30
	pH	<2,2	4,0 a 9,0	>10
Penicillium crustosum produção de penitrem A	Temperatura (ºC)	<17	20 a 26	30
	Atividade de água	0,92	0,995	0,999
Penicillium verrucosum crescimento	Temperatura (ºC)	0	20	31
	pH	<2,1	6,0 a 7,0	>10,0
	Atividade de água	0,79 a 0,83	0,95 a 0,99	>099
Penicillium verrucosum produção de ocratoxina A	Temperatura (ºC)	0	20	31
	Atividade de água	0,86 a 0,87	0,95 a 0,99	>099
Penicillium verrucosum produção de citrinina	Temperatura (ºC)	<12	-	>25
	Atividade de água	<0,93	-	>099

Fonte: ICMSF (1996)

Quadro 6. Concentração de cloreto de sódio e sacarose em várias atividades de água a 25ºC.

Atividade de água	NaCl			Sacarose		
	Molaridade (moles/Kg)	% (peso/volume)	ºSalometro	Molaridade (moles/Kg)	ºBrix	ºBaumé
1,000	0	0	0	0	0	0
0,995	0,150	0,88	3,32	0,272	8,52	4,75
0,990	0,300	1,74	6,57	0,534	15,45	8,59
0,980	0,607	3,43	12,94	1,03	26,07	14,43
0,960	1,20	6,57	24,79	1,92	39,66	21,79
0,940	1,77	9,38	35,40	2,72	48,22	26,34
0,920	2,31	11,90	44,91	3,48	54,36	29,57
0,900	2,83	14,18	53,51	4,11	58,45	31,69
0,880	3,32	16,28	61,43	4,93	62,77	33,90
0,860	3,80	18,18	68,60	5,58	65,63	35,36
0,840	4,26	19,94	75,25			
0,820	4,71	21,59	81,47			
0,800	5,15	23,13	87,28			
0,753	6,16	26,5	100			

Fonte: ICMSF (1980)

Quadro 7. Concentração de glicose e xarope de glicose em várias atividades de água a 25°C.

Atividade de água	Glicose		Açúcar invertido	Xarope de glicose com os seguintes valores de dextrose equivalente (DE)			
	Molaridade (moles/Kg)	% (peso/volume)	% (peso/volume)	% (peso/volume)			
				DE 32,8	DE 42,0	DE 55,0	DE 83,4
0,995	0,259	4,45	2,05	1,74	1,67	1,57	1,36
0,990	0,542	8,90	4,11	3,48	3,34	3,15	2,73
0,980	1,04	15,74	8,22	6,95	6,68	6,30	5,45
0,960	2,21	28,51	16,43	13,90	13,36	12,59	10,90
0,940	3,38	37,83	24,65	17,33	20,03	18,89	16,35
0,920	4,31	43,72	32,87	20,86	26,71	25,19	21,80
0,900	5,24	48,54	41,09	34,77	33,39	31,49	27,25
0,880	6,27	53,05	49,30	41,73	40,07	37,78	32,70
0,860	7,81	58,45	57,52	48,68	46,75	44,08	38,15
0,850	9,00	61,84	61,63	52,16	50,09	47,23	40,88

Fonte: ICMSF (1980)

Quadro 8. Valores aproximados de atividade de água em diferentes alimentos

Alimento	Atividade de água	Alimento	Atividade de água
Vegetais, frutas frescas	> 0,97	Geléia de frutas	0,75 a 0,80
Aves e pescados frescos	> 0,98	Gelatina	0,82 a 0,94
Carne fresca	> 0,95	Arroz	0,80 a 0,87
Ovos	0,97	Farinha de trigo	0,67 a 0,87
Pão	0,95 a 0,96	Mel	0,54 a 0,75
Queijo (maioria)	0,91 a 1,00	Frutas secas	0,51 a 0,89
Queijo tipo parmesão	0,68 a 0,76	Caramelo	0,60 a 0,65
Carne curada	0,87 a 0,95	Cereais	0,10 a 0,20
Bolo assado	0,90 a 0,94	Açúcar	0,10
Nozes	0,66 a 0,84		

Fonte:Franco & Landgraf (2005).

Quadro 9. Atividade de água mínima de crescimento de diferentes microrganismos.

Microrganismo	Atividade de água mínima para crescimento
Bactérias deteriorantes (maioria)	0,90
Bactérias extremamente halófilas	0,75
Leveduras deteriorantes (maioria)	0,88
Leveduras osmofílicas	0,62
Bolores deteriorantes	0,80
Bolores xerofílicos	0,61

Fontes: Jay (2005), Taniwaki & Silva (2001).

Quadro 10. Concentração ótima de sal para crescimento de bactérias halófilas.

Classificação	Concentração ótima de sal	Gêneros de importância em alimentos com espécies desse grupo
Levemente halófilas	0,5 a 3%	São predominantemente de origem marinha, incluindo *Shewanella, Listonella, Pseudomonas, Vibrio, Moraxella, Acinetobacter, Photobacterium*
Moderadamente halófilas	3 a 15%	*Micrococcus, Bacillus, Halomonas, Acinetobacter, Moraxella, Vibrio, Pseudomonas, Marinococcus*
Extremamente halófilas	15 a 30%	*Halococcus, Halobacterium*

Fonte: Baross (2001).

Quadro 11. Atividade de água mínima de crescimento de fungos xerofílicos e leveduras osmofílicas.

Espécie	Atividade de água mínima	Temperatura
Aspergillus candidus	0,75	25
A. conicus	0,70	22
A. flavus	0,78	33
A. fumigatus	0,82	40
A. niger	0,77	35
A. ochraceus	0,77	25
A. restrictus	0,75	25
A. sydowii	0,78	25
A. tamarii	0,78	33
A. terreus	0,78	37
A. versicolor	0,78	25
A. wentii	0,84	25
Basipetospora halophila	0,70	25
Chrysosporium fastidium	0,69	25
C. xerophilum	0,71	25
Debaryomyces hansenii	0,83	25
Emericella nidulans	0,78	37
Eremascus albus	0,70	25
E. fertilis	0,77	25
Eurotium amstelodami	0,70	25
E. carnoyi	0,74	25
E. chevalieri	0,71	33
E. echinulatum	0,62	25
E. herbariorum	0,74	25
E. repens	0,71	21
E. rubrum	0,70	25
Paecilomyces varioti	0,84	25
Penicillium brevicompactum	0,81	23
P. chrysogenum	0,79	25
P. citrinum	0,80	25
P. cyclopium	0,81	25
P. expansum	0,83	23
P. fellutanum	0,80	25
P. frequentans	0,81	23

Quadro 11. Continuação.

Espécie	Atividade de água mínima	Temperatura
P. islandicum	0,83	31
P. martensii	0,79	23
P. patulum	0,81	23
P. puberulum	0,81	23
P. spinulosum	0,80	22
P. viridicatum	0,81	23
Polypaecium pisce	0,70	25
Saccharomyces bailii	0,80	25
Wallemia sebi	0,75	22
Xeromyces bisporus	0,61	25
Zygossaccharomyces rouxii	0,62	30

Fonte: Taniwaki & Silva (2001).

Quadro 12. Valores aproximados de pH de alguns alimentos

Alimento	pH	Alimento	pH
Vegetais		Grapefruit (suco)	3,0
Abóbora	4,8-5,2	Laranja (suco)	3,6-4,3
Aipo	5,7-6,0	Lima	1,8-2,0
Alface	6,0	Maçã	2,9-3,3
Aspargo (flor e caule)	5,7-6,1	Melancia	5,2-5,6
Azeitona	3,6-3,8	Melão	6,3-6,7
Batata (inglesa e doce)	5,3-5,6	Sidra de maçã	3,6-3,8
Berinjela	4,5	Suco de maçã	3,3-4,1
Brócolis	6,5	Uva	3,4-4,5
Cebola (vermelha)	5,3-5,8	**Carnes**	
Cenoura	4,9-5,2; 6,0	Carne moída	5,1-6,2
Couve de bruxelas	6,3	Presunto	5,9-6,1
Couve flor	5,6	Vitela	6,0
Espinafre	5,5-6,0	Frango	6,2-6,4
Fava (vagem e lima)	4,6-6,5	**Laticínios**	
Milho verde	7,3	Creme de leite	6,5
Moranga	5,0-5,4	Leite	6,3 a 6,5
Nabo	5,2-5,5	Manteiga	6,1 a 6,4
Pepino	3,8	Queijo	4,9 a 5,9
Repolho verde	5,4-6,0	**Pescado**	
Ruibarbo	3,1-3,4	Atum	5,2-6,1
Salsa	5,7-6,0	Camarão	6,8-7,0
Tomate (inteiro)	4,2-4,3	Caranguejo	7,0
Frutas		Moluscos	6,5
Ameixa	2,8-4,6	Ostra	4,8-6,3
Figo	4,6	Peixes (maioria) logo após a morte	6,6-6,8

Fonte: Franco & Landgraf (2005).

Quadro 13. pH de crescimento de bactérias acidúricas e acidófilas.

Gênero ou espécie	pH mínimo	pH ótimo	Fonte
Acetobacter	-	4,0 a 6,0	3
Gênero *Alicyclobacillus*	0,5	1,5 a 5,5	1
Alicyclobacillus acidoterrestris	2,0	3,5 a 5,0	1
Bacillus coagulans	4,0	7,0	1
Enterococcus faecium	4,4	-	2
Gluconobacter	3,5	5,0 a 6,0	3
Lactobacillus (maioria)	3,0 a 4,4	5,5 a 6,0	4
Lactobacillus acidophilus	4,0 a 4,6	5,5 a 6,0	4
Lactobacillus plantarum	3,5	5,5 a 6,5	4
Lactococcus lactis	4,3	-	2

Fontes: (1) Vide Capítulo 22, (2) ICMSF (1980), (3) Brenner et al. (2005), (4) Franco & Landgraf (2005)

REFERÊNCIAS

BAROSS, J.A. Halophilic and osmophilic microorganisms. In: DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.** American Public Health Association, Washington, D. C., 2001. Chapter 39, p.387-403.

FDA/CFSAN. **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook "Bad Bug Book"**. Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, March, 1999. http://www.cfsan.fda.gov/~mow/factors.html

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

HAUSCHILD, A.H.W., 1989. *Clostridium botulinum.* In: DOYLE, M.P. (ed), **Foodborne Bacterial Pathogens**, Marcel Dekker Inc.

HERSON, A.C. & HULLAND, E.D. **Canned Foods: Thermal Processing and Microbiology, 7th Ed**. Edinburgh, England: Churchill Livingstone, 1980.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1980. **Microbial Ecology of Foods, Volume 1 – Factors Affecting Life and Death of Microrganisms**. Academic Press, New York.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. **Microrganisms in Foods 5 – Microbiological Specifications of Food Pathogens.** Blackie Academic & Professional, ISBN 0 412 47350 X.

LANDRY, W.L., SCHWAB, A.H. & LANCETTE, G.A. Examination of Canned Foods. In: U. S. Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual Online,* disponível no site <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>, Chapter 21A, revisão de janeiro de 2001.

TANIWAKI, M. H., SILVA, N., 2001. **Fungos em Alimentos: Ocorrência e Detecção**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos.